

Études multiparamétriques de biomarqueurs par immunofluorescence pour mieux suivre la progression
du cancer de la prostate

Par

Sylvie Clairefond

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de Ph.D

en Sciences Biomédicales

Option Médecine Expérimentale

Directeur de thèse

Dre Anne-Marie Mes-Masson

Co-directeur de thèse

Dr Fred Saad

Décembre 2020

© Sylvie Clairefond, 2020

Université de Montréal

Cette thèse intitulée

Études multiparamétriques de biomarqueurs par immunofluorescence pour mieux suivre la progression
du cancer de la prostate

Présentée par

Sylvie Clairefond

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Richard Bertrand

Président-rapporteur

Dre Anne-Marie Mes-Masson

Directeur de thèse

Dr Fred Saad

Co-directeur de thèse

Dr Gerardo Ferbeyre

Membre du jury

Dr David Labbé

Examineur externe

Dre Nathalie Labrecque

Représentante de la doyenne

Résumé (FR)

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la troisième cause de mortalité liée au cancer chez les hommes au Canada. Un quart des patients diagnostiqués développeront une forme plus agressive de ce cancer. Bien que nous possédions plusieurs indices cliniques pronostiques dans les cancers localisés (score de Gleason, taux sérique d'antigène prostatique spécifique (APS), stade, etc.), ceux-ci sont insuffisants pour adéquatement distinguer les patients à faible risque de progression de ceux à haut risque. A ce jour, aucun biomarqueur pronostique n'est encore utilisé en clinique. Les cliniciens ont donc besoin de nouveaux outils plus efficaces pour stratifier ce cancer et pour s'assurer d'adapter au mieux le traitement à chaque patient.

En nous basant sur la littérature et sur des études préliminaires (cohortes de moins de 65 patients), notre hypothèse est que les protéines PUMA-NOXA et les récepteurs membranaires de la famille ERBB seraient, lorsqu'utilisés en combinaison, des biomarqueurs prédictifs de la progression du cancer de la prostate. Les objectifs de cette thèse sont : 1) identifier et valider de bons anticorps pour chaque biomarqueur d'intérêt, 2) définir les niveaux d'expression de chaque biomarqueur sur une cohorte de 285 patients, et 3) établir les corrélations entre les niveaux d'expression et les données cliniques des patients.

Dans l'optique d'une utilisation en clinique, des anticorps de type monoclonal ont été choisis pour identifier les biomarqueurs d'intérêts. Ces anticorps ont été testés et validés pour leur spécificité par immunobuvardage de type western blot et par immunofluorescence. La localisation de la protéine d'intérêt a été validée sur des échantillons de tissus de patients suivie de l'optimisation du multi-marquage sur les cellules épithéliales et basales. Après perfectionnement de l'analyse d'images, nous avons montré qu'une expression extrême (faible ou forte) de PUMA couplée à une forte expression de NOXA dans les glandes bénignes est associée à la rechute biochimique des patients. La présence de ces biomarqueurs dans les glandes bénignes permet d'envisager d'améliorer l'identification lors des premières biopsies des patients se qualifiant pour la surveillance active. Par ailleurs, le suivi de l'expression des récepteurs de la famille ERBB dans les glandes tumorales permet une stratification des patients atteints d'un cancer de la prostate en fonction des risques de rechute biochimique, de développement de métastases et de mort liée au cancer. Ainsi, les patients présentant la combinaison d'une forte expression de EGFR et d'une faible expression de ERBB3 sont les plus susceptibles de mourir spécifiquement de leur cancer de la prostate, en particulier si les cellules tumorales présentes en plus une faible expression de ERBB2 entraînant un fort risque de développer des métastases.

Mon projet de doctorat aura donc permis d'identifier et de valider des biomarqueurs d'intérêt pour prédire l'évolution du cancer de la prostate et démontrer l'intérêt de suivre ces biomarqueurs en combinaison afin d'obtenir une meilleure stratification des patients. Ces résultats devront être validés sur une cohorte indépendante et multicentrique en vue de fournir aux cliniciens un plus grand nombre d'outils pour leur permettre de réaliser une stratification fine des patients atteints d'un cancer de la prostate, et ouvrirait la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées.

Mots-clés : Cancer de la prostate, PUMA, NOXA, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, micro-étalage tissulaire, immunofluorescence.

Abstract (EN)

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the third leading cause of cancer-related death in men in Canada. A quarter of patients will develop a more aggressive form of this cancer. While there are several clinical prognostic variables for localized prostate cancer (Gleason score, prostate specific antigen (PSA) levels, stage, etc.), these are insufficient to adequately distinguish between low and high-risk of progression cases. As a result, clinicians need new, more effective tools to stratify this cancer and to ensure that treatments are best tailored to each patient. To date, no prognostic biomarker has yet been used clinically.

Based on the literature and preliminary studies of small cohorts (less than 65 patients), we hypothesize that the protein expression of PUMA-NOXA and ERBB family members could help with the prediction of prostate cancer progression. The objectives of this thesis are: 1) to identify and validate antibodies for each biomarker of interest, 2) to define the expression levels of each biomarker on a 285 patient cohort, 3) to evaluate the correlation between marker expression levels and patient clinical data.

For clinical use, monoclonal-type antibodies were chosen to identify the biomarkers of interest. These antibodies were validated for specificity by western blot and immunofluorescence techniques. The localization of the protein of interest was further identified within samples of patient tissues and additional optimization involving combinatorial staining for epithelial and basal cells. After refining the imaging and statistical analysis of PUMA and NOXA in benign glands, we found that extreme (weak or strong) PUMA expression coupled with high NOXA expression was associated with biochemical relapse. In addition, these proteins have significant potential for predicting disease evolution based on the initial radical prostatectomy sample. The presence of these proteins in benign glands would allow the identification of patients less suitable for active surveillance. Additionally, statistical analysis of ERBB family receptors in tumor glands, when used alone, allow stratification of prostate cancer patients for the prediction of biochemical relapse, development of metastases and also specific death from prostate cancer. Moreover, patients expressing a combination of high EGFR expression and low ERBB3 expression are at high risk of biochemical relapse and are at higher risk of prostate cancer specific mortality. In addition, coupling this high EGFR – low ERBB3 combination to a low ERBB2 expression helps classify patients at high risk of developing metastases.

My doctoral research project will have made it possible to identify and validate biomarkers of interest for predicting the progression of prostate cancer and demonstrating the interest of combining

these biomarkers in order to achieve better stratification of patients with prostate cancer. In the context of clinical utility, these results need to be validated on an independent and multicenter cohort in order to confirm these findings. This would eventually provide clinicians with a greater number of tools at their disposal to correctly anticipate patient trajectories and possibly identify new therapeutic targets for the control of the disease.

Keywords : Prostate cancer, PUMA, NOXA, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, tissue micro-array, immunofluorescence.

Table des matières

Résumé (FR)	3
Abstract (EN)	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des abréviations	12
Liste des publications et contributions	14
Remerciements	16
1 INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer en général et la médecine personnalisée	1
1.2 La prostate	2
1.2.1 Architecture de la prostate	3
1.2.2 Histologie de la prostate	5
1.2.3 Pathologies bénignes de la prostate.....	6
1.3 Le cancer de la prostate	7
1.3.1 Statistiques	8
1.3.2 Considérations cliniques du cancer de la prostate	10
1.3.2.1 Dépistage du cancer de la prostate	10
1.3.2.2 Diagnostic du cancer de la prostate.....	13
1.3.2.3 Examens complémentaires du cancer de la prostate	13
1.3.2.4 Classification du cancer de la prostate	14
1.3.3 Traitements et évolution du cancer de la prostate	17
1.3.3.1 Surveillance active	18
1.3.3.2 Traitements de première ligne	19
1.3.3.3 Traitements de seconde ligne.....	20
1.4 L'utilisation de biomarqueurs	23
1.4.1 Synthèse des biomarqueurs étudiés en cancer de la prostate	25
1.4.1.1 Biomarqueurs approuvés par la FDA pour le cancer de la prostate	25

1.4.1.2	Biomarqueurs avec un potentiel pronostique du cancer de la prostate	26
1.4.2	Présentation des biomarqueurs d'intérêt de ce projet de recherche	31
1.4.2.1	Famille des protéines BCL-2.....	31
1.4.2.1.1	Rôle de PUMA et NOXA dans la cellule	33
1.4.2.1.2	Expression de PUMA et NOXA dans les cancers	35
1.4.2.2	Famille ERBB : EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4	35
1.4.2.2.1	Rôle de EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4 dans la cellule	36
1.4.2.2.2	Expression des membres de la famille ERBB dans les cancers.....	39
1.4.2.2.3	Approches thérapeutiques ciblant les membres de la famille ERBB	41
1.4.2.2.4	Expression des membres de la famille ERBB et approches thérapeutiques les ciblant dans le cancer de la prostate	43
1.5	Projet de thèse : Études multiparamétriques de biomarqueurs par immunofluorescence pour mieux suivre la progression du cancer de la prostate	45
1.5.1	Problématique du projet de recherche	45
1.5.2	Hypothèses de travail	45
1.5.3	Objectifs de recherche.....	46
2	RÉSULTATS.....	47
2.1	Chapitre 1 : PUMA and NOXA expression in tumor-associated benign prostatic epithelial cells are predictive of prostate cancer biochemical recurrence.....	47
2.1.1	Article #1 : Résumé en français.....	47
2.1.2	Article #1 : Version finale soumise à <i>Cancers</i>	47
2.1.2.1	Simple Summary	48
2.1.2.2	Graphical Abstract	49
2.1.2.3	Abstract.....	49
2.1.2.4	Introduction	50
2.1.2.5	Results.....	51
2.1.2.6	Discussion	60
2.1.2.7	Materials and Methods.....	61
2.1.2.8	Conclusions	65
2.1.2.9	References	66
2.1.2.10	Supplementary materials	69
2.2	Chapitre 2 : Expression of ERBB family members as predictive markers of prostate cancer progression and mortality	77

2.2.1	Article #2 : Résumé en français.....	77
2.2.2	Article #2 : Version originale soumise et sous révision à <i>Cancers</i>	77
2.2.2.1	Simple Summary	78
2.2.2.2	Abstract.....	79
2.2.2.3	Introduction	79
2.2.2.4	Materials and Methods.....	81
2.2.2.5	Results.....	84
2.2.2.6	Discussion	97
2.2.2.7	Conclusions	99
2.2.2.8	References	100
2.2.2.9	Supplementary materials.....	106
3	DISCUSSION	109
3.1	Approche des techniques d’immunohistochimie et d’immunofluorescence	109
3.1.1	Technique d’immunohistochimie (IHC)	110
3.1.2	Technique d’immunofluorescence (IF)	111
3.2	Optimisation de la technique d’immunofluorescence	115
3.2.1	Choix et spécificité des anticorps pour les protéines d’intérêts	115
3.2.2	Optimisation du multi-marquages.....	117
3.2.2.1	Harmonisation du marquage des cellules épithéliales	117
3.2.2.2	Ajout d’un marquage pour les cellules basales.....	118
3.2.3	Perfectionnement de l’analyse d’image	120
3.3	Potentiel réel des biomarqueurs de ce projet de recherche.....	121
3.4	Combinaison des biomarqueurs.....	125
4	CONCLUSION	128
5	BIBLIOGRAPHIE.....	129

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition histologique du nouveau système de classification des groupes de grade.....	15
Tableau 2: Définition du système de classification du stade de la progression de la maladie.....	16
Tableau 3: Liste des structures, fonctions et membres de la famille des BCL-2.....	32
Tableau 4 : Récapitulatif des données de courbe ROC pour chaque biomarqueur, seul et en combinaison, en fonction des risques d'évolution de la maladie	125

Liste des figures

Figure 1: Description du circuit hormonal chez l'homme.....	3
Figure 2: Description de l'anatomie de la prostate et des organes avoisinants.	4
Figure 3: Description des quatre zones distinctes de la prostate.....	5
Figure 4: Description de l'histologie de la prostate.....	6
Figure 5: Taux d'incidence normalisés selon l'âge (TINA) des trois cancers les plus diagnostiqués chez les hommes au Canada (à l'exception du Québec), 1984 à 2019.	9
Figure 6: Taux de mortalité normalisés selon l'âge (TMNA) des trois cancers les plus mortels chez les hommes au Canada, 1984 à 2019.	10
Figure 7: Histogramme de la correspondance de la valeur d'APS total en fonction de la prévalence du cancer de la prostate.	12
Figure 8: Profils histologiques schématisés de l'adénocarcinome prostatique de 2015 modifiés de la Société internationale de pathologie urologique.....	15
Figure 9: Les différents stades du cancer de la prostate.	17
Figure 10: Illustration des lignes directrices des traitements en fonction de la progression du cancer de la prostate.	18
Figure 11: Structure des protéines membres de la famille des BCL-2 (B-cell lymphoma 2).....	32
Figure 12: Voie de signalisation mitochondriale de l'apoptose ciblée sur les protéines PUMA et NOXA.	33
Figure 13: Structure de l'activation et de la dimérisation des membres de la famille des ERBBs.....	37
Figure 14: Schéma des affinités spécifiques entre les membres ERBBs et les ligands.	38
Figure 15: Schéma des potentiels homo et hétéro dimères et des voies de signalisation activées par les membres de la famille ERBBs.	39
Figure 16: Résumé des approches thérapeutiques existantes pour les membres de la famille ERBBs.....	43
Figure 17: Représentation de l'immuno-marquage direct et de l'immuno-marquage indirect.	110
Figure 18: Spectre de fluorescence des principaux fluorochromes utilisés en IF.....	112

Liste des abréviations

AMACR	α -methylacyl-CoA racemase
AR	récepteur aux androgènes
AR-V7	récepteur aux androgènes variant 7
APS	antigène prostatique spécifique
CK 8	cytokératine 8
CK 18	cytokératine 18
CK HMW	cytokératine de hauts poids moléculaires
CPRC	cancer de la prostate résistant à la castration
DHT	5 α -dihydrotestostérone
ECAD	E-cadhérine
EGFR / HER1	epidermal growth factor receptor
ERBB2 / HER2	receptor tyrosine kinase erbB-2
ERBB3 / HER3	receptor tyrosine-protein kinase erbB-3
ERBB4 / HER4	receptor tyrosine-protein kinase erbB-4
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FDA	food drug administration
LH	hormone lutéinisante
LH-RH	luteinizing hormone-releasing hormone
NIP	néoplasie intra-épithéliale de la prostate
NOXA	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
PCA3	antigène 3 du cancer de la prostate
PSMA	antigène membranaire prostatique spécifique

PTEN	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 3-phosphatase
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RANKL	receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

Liste des publications et contributions

Pierre-Olivier Gaudreau*, **Sylvie Clairefond***, Caleb A. Class, Pierre-Luc Boulay, Pavel Chrobak, Bertrand Allard, Feryel Azzi, Sandra Pommey, Kim-Anh Do, Fred Saad, Dominique Trudel, Marian Young, John Stagg (2019) WISP1 is associated to advanced disease, EMT and an inflamed tumor microenvironment in multiple solid tumors. *Oncolimmunology*, Vol (8):5. *These authors contributed equally (1)

Publications incluses dans cette thèse

Sylvie Clairefond, Benjamin Péant, Véronique Ouellet, Véronique Barrès, Zhe Tian, Dominique Trudel, Pierre I. Karakiewicz, Anne-Marie Mes-Masson, Fred Saad (2020) PUMA and NOXA expression in tumor-associated benign prostatic epithelial cells are predictive of prostate cancer biochemical recurrence. *Cancers* 2020, 12, 3187. Special Issue “Novel Biomarkers and Molecular Targets in Cancer” (2)

⇒ **Inclue comme Chapitre 1**

Conception and design	Clairefond S, Péant B, Ouellet V, Mes-Masson AM, Saad F
Acquisition of data	Clairefond S, Barrès V
Analysis and interpretation of data	Clairefond S, Péant B, Ouellet V, Tian Z, Karakiewicz P
Drafting of the manuscript	Clairefond S, Péant B, Ouellet V
Critical revision of the manuscript for important intellectual content	Trudel D, Karakiewicz P, Mes-Masson AM, Saad F
Statistical analysis	Clairefond S
Obtaining funding	Clairefond S, Mes-Masson AM, Saad F
Administrative, technical, or material support	Tian Z, Karakiewicz P
Supervision	Péant B, Ouellet V, Mes-Masson AM, Saad F
Other (specify)	Trudel D (tissue slice revision)

Sylvie Clairefond, Véronique Ouellet, Benjamin Péant, Véronique Barrès, Pierre I. Karakiewicz, Anne-Marie Mes-Masson, Fred Saad (2021) Expression of ERBB family members as predictive markers for prostate cancer progression. (3)

Soumis et sous révision dans *Cancers* pour Special Issue “Prognostic and Predictive Biomarkers of Prostate Cancer”

⇒ **Inclue comme Chapitre 2**

Conception and design	Clairefond S, Ouellet V, Péant B, Mes-Masson AM, Saad F
Acquisition of data	Clairefond S, Barrès V
Analysis and interpretation of data	Clairefond S, Ouellet V, Péant B, Karakiewicz P
Drafting of the manuscript	Clairefond S, Ouellet V, Péant B
Critical revision of the manuscript for important intellectual content	Karakiewicz P, Mes-Masson AM, Saad F
Statistical analysis	Clairefond S
Obtaining funding	Clairefond S, Mes-Masson AM, Saad F
Administrative, technical, or material support	Karakiewicz P
Supervision	Ouellet V, Péant B, Mes-Masson AM, Saad F
Other (specify)	

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de recherche, Dre Anne-Marie Mes-Masson et à mon co-directeur de recherche, Dr Fred Saad. Je vous adresse toute ma reconnaissance d'avoir bien voulu me donner l'opportunité de réaliser mon doctorat dans votre laboratoire. Vous détenez une grande place dans le monde scientifique et vous avez toujours été présents pour répondre à mes nombreuses questions aussi bien administratives que techniques, pour faire la correction de mes nombreux documents (résumés, demandes de bourses) et finalement ce mémoire de doctorat. Je vous remercie très chaleureusement pour toute la confiance que vous m'avez accordée et pour le temps que vous m'avez octroyé durant mes années de doctorat. En intégrant votre laboratoire, j'ai aussi intégré une grande famille scientifique ce qui m'a permis d'apprendre et de grandir professionnellement et aussi personnellement.

Je remercie bien évidemment les membres de mon comité de parrainage de doctorat, Dr Francis Rodier et Dr Jacques Lapointe, dont les conseils et suggestions m'ont été d'une grande aide tout au long du cheminement de mon doctorat. Je remercie également les membres du jury d'évaluation de cette présente thèse et les efforts qu'ils ont consentis à investir dans l'étape finale de mon doctorat.

Je veux aussi adresser mes remerciements à la globalité de l'institut du cancer de Montréal (administratif comme membre), pour l'ambiance chaleureuse qui m'a permis d'avoir une atmosphère de travail très agréable, puis avec qui j'ai pu participer à de magnifiques événements comme bénévolé.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, présents et passés, qui, à travers leurs conseils, leurs collaborations et leur amitié, m'ont permis d'avancer tout au long de cette aventure. Je ne ferai pas de liste de peur d'oublier quelqu'un alors MERCI À TOUS. Je profite de ce paragraphe pour adresser une mention spéciale à Amine qui m'a apporté une aide précieuse durant la dernière ligne droite de mon doctorat.

Plus spécifiquement, je tiens à remercier les deux associés de recherche qui ont su m'encadrer durant mes années de doctorat, Dre Véronique Ouellet & Dr Benjamin Péant. J'ai souvent, voir même trop souvent, cogné à votre porte puis vous avez toujours su me répondre avec le sourire. Il y a aussi les congrès que nous avons eu l'occasion de partager ensemble et qui nous ont permis de couper avec le quotidien du laboratoire.

J'adresse aussi un gros MERCI aux filles de la plateforme TMA Team & d'Imagerie, Véronique B, Liliane, Christine, Monique, Gabriela et Aurélie, avec qui j'ai fortement collaboré et qui m'ont donné tous les éléments nécessaires pour maîtriser toutes les techniques afin de réaliser ce projet de doctorat. De ces collaborations sont nées de grands moments de rire et d'échange amical.

De façon plus personnelle, je dédie ces quelques lignes de remerciement à de supers collègues (Laudine, Gany, Hubert, Nicolas M., David et Yannick) qui ont été merveilleux dès mon arrivée au laboratoire et qui au fil des années sont devenus de vrais amis. Puis il y a aussi ceux qui sont arrivés après moi ou avec qui j'ai développé une amitié plus tardivement (Kayla, Maxime, Marjorie, Anne-Marie D et Pam), et qui aujourd'hui comptent énormément pour moi. Malgré une grande majorité de français que vous êtes, vous constituez ma vraie famille québécoise, je vous aime sincèrement.

Bien évidemment, je n'oublie pas mes amis présents pour moi à l'extérieur du CRCHUM, encore ici ou bien déjà rentré en France (Marine, Olivia, Pierre). Nous avons commencé nos doctorats à des dates très rapprochées et nous avons toujours été là les uns pour les autres durant les différentes phases de ces années d'études et j'espère que nous resterons toujours aussi soudés.

Dans ces remerciements, je ne peux pas oublier mes origines françaises, qui incluent bien évidemment tous mes amis restés en France. Vous avez toujours su me soutenir dans ma décision d'expatriation. Malgré la distance, il y a ceux qui nous rapprochent en nous accordant toujours une place importante dans leur vie. Alicia tu as voulu que je sois ton témoin de mariage, un des plus beaux cadeaux que je n'ai jamais reçus. Léa & Mickael vous m'accordez le bonheur de pouvoir devenir la marraine de votre petite poupée Lucie. Puis il y a ceux qui ont profité de cette expatriation pour voyager et venir découvrir mon univers de vie (Nicolas & Cyril, Alexandre, Sophie & Jeremy, Camille, Guillaume) et ceux qui n'ont pas encore eu cette opportunité mais qui ont l'envie (Jérémy, Amithys & Simon).

Puis il y a bien évidemment le soutien que j'ai reçu de la part de ma famille (Maman, Papa, Tatie Odile, Patrick, Thierry et Tristan) et de ma belle-famille de cœur (Evelyne, Pierre, Mamie Thérèse, Tatie Marilou, Cindy, Johnny, Soan et Callie) alors que vous ne comprenez pas toujours ce que je faisais durant mon doctorat. Et finalement, il y a Teddy qui a partagé ma vie durant ces 15 dernières années et qui a toujours su faire reculer mes limites et me faire devenir la femme que je suis aujourd'hui.

MERCI À VOUS TOUS D'AVOIR RENDU MON AVENTURE DE DOCTORAT SI BELLE.

1 INTRODUCTION

1.1 Le cancer en général et la médecine personnalisée

Dans un contexte normal, chaque cellule possède toutes les informations génétiques nécessaires pour son développement, son fonctionnement, sa division et sa mort (Bruce Alberts *et al.*, 2017). Cependant, certaines cellules peuvent, un jour, avoir une prolifération anormale et incontrôlée. Ce phénomène peut subvenir dans n'importe quel type de cellules d'un organe, d'une glande, d'un tissu musculaire, du sang ou encore du système lymphatique (Cooper, 2000). Le passage d'une cellule normale vers un état cancéreux se définit par la transformation cellulaire (Cooper, 2000). Dans le cas des tumeurs solides, cette cellule va proliférer pour former une masse appelée tumeur primaire de type bénin ou malin. Dans le cas des cancers sanguins, il s'agit d'un syndrome myélodysplasique lors de prolifération anormale des cellules sanguines matures. La transformation cellulaire comprend le maintien de la signalisation proliférative, l'évitement des gènes suppresseurs de tumeurs (gènes capables d'inhiber la croissance cellulaire), la résistance à la mort cellulaire, l'activation de l'immortalité répllicative, l'induction de l'angiogenèse (processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins) et l'activation de l'invasion (envahissement de l'organisme) entraînant le développement de métastases (croissance cellulaire à distance du site primaire). Ces six caractéristiques ont été les premières identifiées comme communes à tous les types de cancers (Hanahan *et al.*, 2000). Depuis, de nouvelles recherches ont montré que ces six éléments ne sont pas les seuls qu'une cellule normale acquière lors de sa transformation en une cellule cancéreuse. En 2011, Hanahan & Weinberg (Hanahan *et al.*, 2011) publie une actualisation de ces éléments en ajoutant quatre nouvelles caractéristiques communes à toutes les cellules cancéreuses : la dérégulation métabolique, l'échappement à la réponse immunitaire, l'inflammation oncogénique et l'instabilité génomique.

Malgré le fait que chaque cancer présente des caractéristiques communes, un traitement universel n'est pas disponible à ce jour. De plus, plusieurs patients avec un même type de cancer ne répondront pas de la même manière à un même traitement, ou encore pour deux cancers différents, un même traitement pourra être efficace. Avec une telle complexité, la gestion thérapeutique des patients atteints d'un cancer devait être adaptée et la médecine personnalisée, aussi appelé médecine de précision, a fait son apparition (Garraway *et al.*, 2013). Durant les dernières décennies, de nombreuses études ont porté sur la compréhension des changements intervenant dans une cellule et entraînant le développement et la progression du cancer. Ces études ont ciblé le profil génétique et moléculaire des tumeurs afin d'identifier

des cibles impliquées dans l'augmentation du risque de la progression du cancer. De plus, la compréhension de ces anomalies génétiques et/ou moléculaires permet de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. La médecine personnalisée a réalisé des progrès dans plusieurs domaines comme une meilleure identification des sous-types de cancer en fonction des profils génétiques ou protéiques et l'élaboration de nombreux agents chimiques spécifiques. Un exemple probant est l'identification de la protéine ERBB2 (HER2) qui est surexprimée chez environ 15 à 20% des patientes atteintes d'un cancer du sein (Slamon *et al.*, 1987) (Guarneri *et al.*, 2010). Cette protéine est utilisée pour stratifier ce cancer en différents sous-types (Curtis *et al.*, 2012) en plus de servir de cible thérapeutique (Wilson *et al.*, 2018). Cette stratification des cancers du sein en lien avec le niveau d'expression de la protéine ERBB2 va permettre d'établir un pronostic d'évaluation de la maladie pour chaque patiente. ERBB2 est un facteur de croissance qui participe dans la croissance, la différenciation et le contrôle du métabolisme cellulaire. Un cancer caractérisé par une forte expression de ERBB2 sera donc généralement plus agressif et conduira à un pronostic moins favorable pour la patiente (Bayani *et al.*, 2017). Les patientes qui surexpriment cette protéine peuvent bénéficier d'un traitement au Trastuzumab. Il s'agit d'un anticorps monoclonal recombinant dirigé spécifiquement contre le domaine extracellulaire du récepteur ERBB2 afin d'inhiber ses fonctions et de limiter la progression cancéreuse. La réussite de ce traitement par Trastuzumab est illustrée par un meilleur pronostic pour les patientes. Cet exemple, bien que significatif, ne représente que le début de la médecine personnalisée et son développement devra passer par l'identification et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs et donc de nouvelles cibles thérapeutiques.

1.2 La prostate

La prostate est une glande appartenant à l'appareil uro-génital masculin. La fonction principale de la prostate est la production du liquide prostatique riche en protéines, dont une panoplie d'enzymes et de minéraux, et qui aide à la protection et à l'enrichissement des spermatozoïdes (Isaacs, 1983). Lors de l'activité sexuelle, la prostate délivre le liquide prostatique dans les canaux jusqu'à l'urètre, où ce liquide est mélangé avec les spermatozoïdes et d'autres liquides avant d'être éjaculé sous forme de sperme. La prostate contrôle l'écoulement urinaire et l'éjaculation par le relâchement ou la contraction de ses fibres musculaires au moment d'uriner ou lors de l'orgasme. La prostate fabrique également la protéine antigène prostatique spécifique (APS) qui aide le sperme à demeurer liquide après l'éjaculation (Balk *et al.*, 2003).

Les cellules prostatiques sont androgéno-dépendantes. Ces androgènes sont composés à 90 % de testostérone. La sécrétion de la testostérone est contrôlée par le cerveau (Cartwright *et al.*, 1986), plus spécifiquement par l'hypothalamus, qui produit une hormone appelée hormone de libération de la gonadotrophine (LH-RH et de l'anglais *luteinizing hormone-releasing hormone*) qui va, à son tour, stimuler l'hypophyse pour libérer l'hormone lutéinisante (LH) (Cartwright *et al.*, 1986). La LH va être acheminée aux testicules par la circulation sanguine pour y stimuler la production et la sécrétion de la testostérone (Cartwright *et al.*, 1986). Au niveau des testicules, la testostérone est convertie en 5 α -dihydrotestostérone (DHT), son métabolite le plus actif (Figure 1). La testostérone et la DHT vont exercer leurs fonctions biologiques en se liant aux récepteurs des androgènes (AR) qui sont exprimés par les cellules épithéliales prostatiques normales (Heinlein *et al.*, 2004). Le AR est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Heinlein *et al.*, 2004).

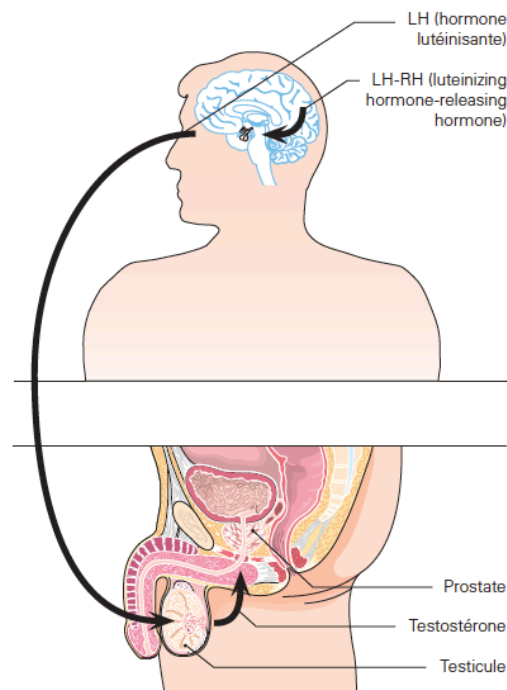


Figure 1: Description du circuit hormonal chez l'homme.

Provenant de (F. Saad, McCormack, M., 2019).

1.2.1 Architecture de la prostate

A l'état normal, la prostate a une taille d'environ 3 cm de hauteur et 4 cm de large. Elle ne pèse pas plus de 20 g et sa texture est lisse et caoutchouteuse au toucher (F. Saad, McCormack, M., 2019). Elle est

située en profondeur dans le bassin de l'homme, sous la vessie et devant le rectum (Packer *et al.*, 2016) (F. Saad, McCormack, M., 2019). Elle est formée de deux lobes qui entourent la partie supérieure de l'urètre, le conduit qui transporte l'urine et le sperme vers l'extérieur du pénis (Figure 2).

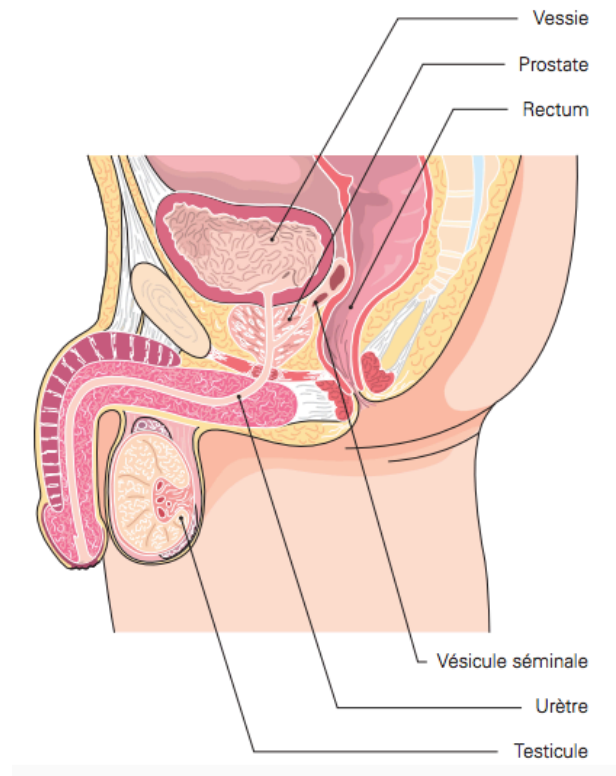


Figure 2: Description de l'anatomie de la prostate et des organes avoisinants.

Provenant de (F. Saad, McCormack, M., 2019).

La prostate est un organe qui a une anatomie relativement simple. Elle est divisée en quatre zones distinctes. La **zone périphérique** (ZP sur la figure 3), située à l'arrière de la glande, constitue plus de 70 % de la prostate glandulaire (McNeal, 1981). C'est dans cette zone que la majorité des adénocarcinomes se développent (McNeal, 1981) (Packer *et al.*, 2016). La **zone centrale** (ZC sur la figure 3) représente 25 % de la prostate glandulaire (McNeal, 1981). Elle entoure les canaux éjaculateurs qui se réunissent au point de rencontre avec l'urètre descendante pour former la vésicule séminale (McNeal, 1981) (Packer *et al.*, 2016). La **zone transitionnelle** (ZT sur la figure 3), située directement sous la vessie et qui entoure l'urètre, constitue moins de 1% de la prostate glandulaire (McNeal, 1981) (Packer *et al.*, 2016). C'est en général dans cette zone restreinte que se développent les hyperplasies bénignes de la prostate (McNeal, 1981) (Packer *et al.*, 2016). Finalement le **stroma fibromusculaire antérieur** (SFA sur la figure 3) forme la totalité de la surface antérieure de la prostate (McNeal, 1981) (Packer *et al.*, 2016). Cette zone entièrement non

glandulaire ne possède aucune fonction prostatique. Elle représente néanmoins, environ un tiers de la masse du tissu de la capsule prostatique. Il s'agit d'un épaissement du tissu de la glande qui est à l'origine de la convexité caractéristique de la surface antérieure de la prostate (McNeal, 1981).

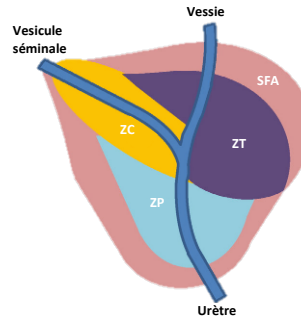


Figure 3: Description des quatre zones distinctes de la prostate.

ZP = Zone Périphérique, ZC = Zone Centrale, ZT = Zone Transitionnelle, SFA = Stroma Fibromusculaire Antérieur. Traduite de (Packer *et al.*, 2016).

1.2.2 Histologie de la prostate

L'histologie prostatique, très hétérogène, se compose de glandes organisées et entourées d'un stroma de soutien (Abate-Shen *et al.*, 2000) (Xin, 2013) (Henry *et al.*, 2018). Plus spécifiquement, la prostate est constituée de trois types de tissus : 1) le tissu glandulaire qui produit le mucus et le liquide prostatique se mélangeant aux spermatozoïdes et à d'autres liquides pour former le sperme, 2) le tissu musculaire qui contrôle le jet de l'urine et de l'éjaculation, et 3) le tissu fibreux qui maintient la structure de la glande. Les glandes composant le tissu glandulaire sont de type tubulo-alvéolaires, c'est-à-dire à embranchements relativement simples et avec des conduits qui sont composés d'un épithélium cylindrique pseudostratifié (Figure 4). Cet épithélium est formé de trois types de cellules : luminales, basales et neuroendocrines (Abate-Shen *et al.*, 2000) (Xin, 2013) (Henry *et al.*, 2018). Les **cellules luminales** forment la majorité de l'épithélium de la prostate et remplissent la fonction sécrétoire (Abate-Shen *et al.*, 2000) (Xin, 2013). Elles dépendent de la présence des androgènes pour leur survie (Abate-Shen *et al.*, 2000) (Xin, 2013). Les cytokératines 8 et 18 (CK8 et CK18) sont les principaux biomarqueurs permettant de les identifier (Nagle *et al.*, 1987). Une couche de **cellules basales** pluripotentes recouvre les cellules luminales. Ces cellules sont responsables de la régénération de l'épithélium glandulaire prostatique et servent de barrière pour protéger les cellules luminales des nombreuses agressions (polluants) endommagent leur matériel génétique (Abate-Shen *et al.*, 2000) (Xin, 2013). Elles expriment les cytokératines de hauts poids moléculaires (CK HMW) et p63 (Signoretti *et al.*, 2000) (M. Zhou *et al.*,

2003). Les **cellules neuroendocrines** forment le troisième type cellulaire constituant cet épithélium. Elles sont associées à la différenciation et à la croissance des cellules épithéliales prostatiques. Elles ne représentent qu'une petite fraction des cellules de la prostate. Elles expriment la chromogranine A et la sérotonine (di Sant'Agnese, 1998) (Abate-Shen *et al.*, 2000) (Xin, 2013).

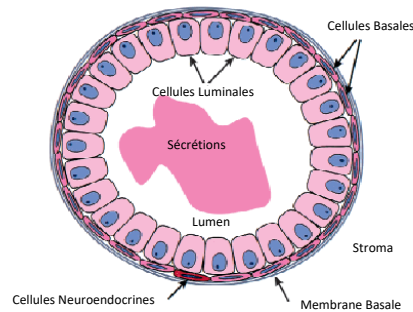


Figure 4: Description de l'histologie de la prostate.

Traduite de (Abate-Shen *et al.*, 2000).

Le stroma, constituant 40 % du volume de la prostate, est composé de fibroblastes et de cellules musculaires lisses (Kassen *et al.*, 1996). Les fibroblastes représentent 10 à 15 % du stroma et ils sont responsables de la production de la matrice extracellulaire de collagène et d'élastine. Ils sécrètent en outre plusieurs facteurs de croissance et des cytokines qui influencent indirectement la croissance et la différenciation des cellules épithéliales prostatiques. Les cellules musculaires lisses forment le reste du stroma. Elles facilitent l'expulsion des sécrétions des cellules épithéliales prostatiques vers la lumière glandulaire en se contractant lors de l'éjaculation (Kassen *et al.*, 1996). Le stroma prostatique contient également le réseau de vascularisation et d'innervation de la prostate, et des cellules immunitaires telles que des lymphocytes et des macrophages (Bianchi-Frias *et al.*, 2010).

1.2.3 Pathologies bénignes de la prostate

Vers l'âge de 30 ans la prostate augmente peu à peu de volume. De ce fait, la prostate risque parfois, en grossissant, de comprimer le canal urinaire qui la traverse et peut alors causer quelques troubles tels que des difficultés à uriner, un faible débit urinaire ou un besoin constant d'uriner. Il est à noter que le fait d'avoir un diagnostic d'une pathologie bénigne n'augmente pas les risques de développer un cancer de la prostate.

Bien que désagréable, l'**hypertrophie bénigne de la prostate** n'est pas cancéreuse. Il s'agit d'une augmentation du volume de la prostate, due à une prolifération excessive des cellules de la zone

transitionnelle. Cette maladie bénigne touche la plupart des hommes âgés, notamment les hommes de plus de 50 ans, et sa cause semble être liée à des variations hormonales, en particulier de la testostérone et de la dihydrotestostérone. Cette maladie ne met pas la vie de l'homme en danger mais les symptômes sont généralement gênants pour ce dernier. Le traitement utilisé pour cette maladie est la prostatectomie transurétrale échoguidée par laser. La résection par laser va permettre d'enlever l'excès de tissus prostatique qui nuit à l'évacuation de l'urine (F. Saad, McCormack, M., 2019).

La **prostatite** peut être une maladie infectieuse causée par une bactérie qui provient soit d'une infection urinaire soit d'une infection transmissible sexuellement. Un simple traitement à base d'antibiotique permet de la guérir (F. Saad, McCormack, M., 2019). Cependant, certains hommes vont avoir des douleurs dans le bas-ventre sans souffrir d'infection, il s'agit alors d'une prostatite chronique, aujourd'hui nommée douleurs pelviennes chroniques, car la prostate n'est pas forcément en cause. Les traitements utilisés dans ce cas sont basés sur l'emploi d'antibiotiques, d'anti-inflammatoires et des médicaments qui relâchent les muscles lisses de la prostate (F. Saad, McCormack, M., 2019).

La **néoplasie intra-épithéliale de la prostate** (NIP) est une croissance anormale et incontrôlée des cellules épithéliales qui tapissent la paroi des glandes de la prostate. Elle peut survenir à plusieurs endroits dans la prostate et est alors qualifiée de NIP multifocale. Elle est généralement détectée lors d'une biopsie ou lors d'une résection transurétrale de la prostate. La NIP peut être de bas grade, dysplasie difficile à différencier des lésions bénignes, ou de haut grade, avec présence d'anomalies au niveau des noyaux et du cytoplasme des cellules prostatiques. Il est à noter que la forme de haut grade de NIP est considérée comme une lésion précurseur du cancer de la prostate (De Marzo *et al.*, 2007) (De Marzo *et al.*, 2016) (Trabzonlu *et al.*, 2019).

1.3 Le cancer de la prostate

Lors de la formation d'un cancer, la littérature a mis en évidence la présence d'altérations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs en lien avec la transformation cellulaire. L'origine de ces altérations peut être soit exogène (facteurs environnementaux tels que l'alimentation, le tabac, les radiations et la pollution), soit endogène (provoqué en partie par des molécules issues du métabolisme de l'hôte et les facteurs génétiques) (U.S. National Library of Medicine, 2013).

Il existe plusieurs types de tumeurs cancéreuses de la prostate. Les plus rares sont de types carcinomes et inclus le carcinome urothélial, les tumeurs carcinoïdes, le carcinome épidermoïde, pour ne

nommer que ceux-ci (Xin, 2019). Il est aussi important de mentionner le carcinome à petites cellules qui est une maladie affectant les cellules neuroendocrines présentes dans la prostate. Ces cellules peuvent être à l'origine de tumeurs neuroendocrines primaires *de novo*, ou générer une différenciation neuroendocrine d'un adénocarcinome prostatique coexistant ou antérieur (Priemer *et al.*, 2016). Ce carcinome est considéré comme particulièrement agressif puisque sa présence augmente la progression de la maladie même après l'utilisation de traitement de type thérapie par privation androgénique (Hirano *et al.*, 2004). La totalité de ces carcinomes ne représentent qu'environ 5 à 10 % des cancers de la prostate.

Le cancer de la prostate (aussi appelé adénocarcinome de la prostate) représente 90 à 95 % de tous les types de cancer de la prostate (Xin, 2019). Les cellules qui deviennent cancéreuses sont généralement les cellules glandulaires et plus particulièrement celles de la zone périphérique. Ce cancer est caractérisé par une hyper prolifération des cellules luminales, une perte de la couche basale, une rupture de la membrane basale, une infiltration du tissu par des cellules immunitaires et une réactivité stromale (Packer *et al.*, 2016). Il est à noter que le cancer de la prostate se développe habituellement en plusieurs foyers, il est donc qualifié de multifocal. Dans la majorité des cas, le cancer de la prostate est, dans ces stades précoces, asymptomatique, ce qui veut dire qu'un homme peut vivre avec cette maladie sans se douter de rien et jusqu'à la détection de celui-ci (F. Saad, McCormack, M., 2019). Dans 80 % des cas, la découverte du cancer de la prostate est faite de façon fortuite lors d'un examen de routine chez le médecin. La prise en charge thérapeutique des patients va dépendre en grande partie du degré de progression des cellules cancéreuses (F. Saad, McCormack, M., 2019).

1.3.1 Statistiques

En 2020 et d'après la société canadienne du cancer (Brenner *et al.*, 2020), un homme sur neuf développera un cancer de la prostate ce qui en fait le cancer le plus diagnostiqué chez les canadiens. Plus spécifiquement, il est estimé que, chaque année, 23 300 hommes recevront un diagnostic de cancer de la prostate, soit 20,1 % de tous les nouveaux cas de cancer chez l'homme (Brenner *et al.*, 2020). Il est à noter que le taux d'incidence du cancer de la prostate a atteint des sommets en 1993 et en 2001 (Figure 5) (Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer, 2019). Ces deux pics ont été suivis par une baisse associée à la mise au point du test de dépistage par dosage de l'APS sanguin et à son utilisation intensive. Depuis 2001, le taux d'incidence est en constante diminution.

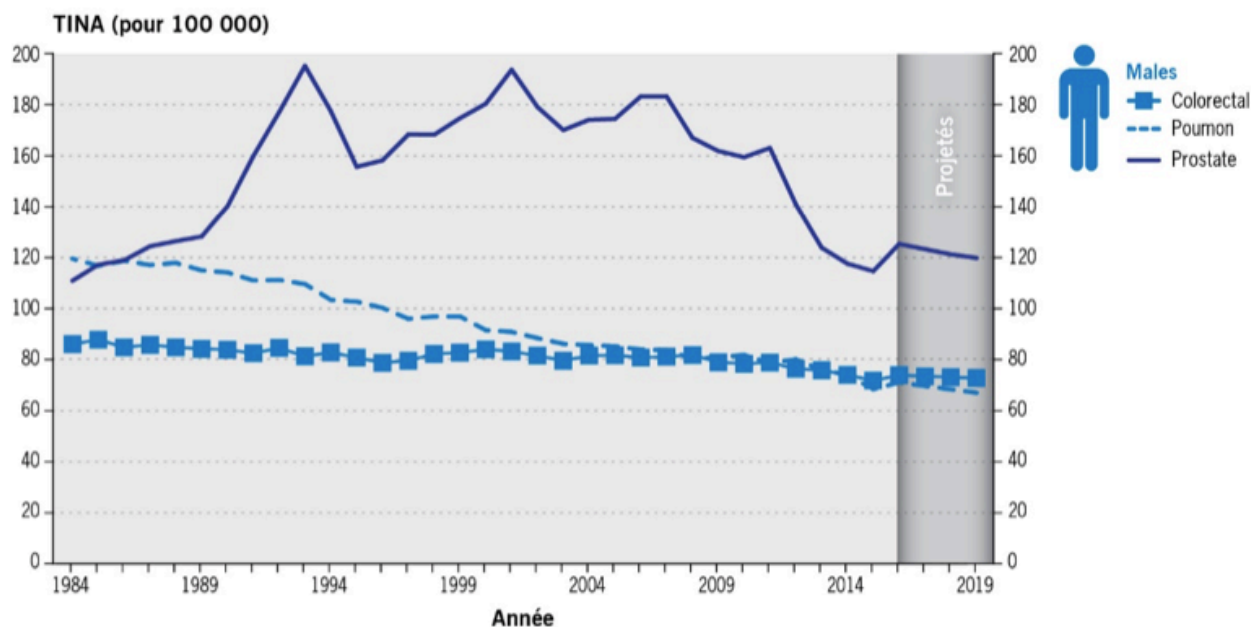


Figure 5: Taux d'incidence normalisés selon l'âge (TINA) des trois cancers les plus diagnostiqués chez les hommes au Canada (à l'exception du Québec), 1984 à 2019.

Données provenant de (Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer, 2019).

Le cancer de la prostate est la troisième cause de décès par cancer chez les canadiens, un homme sur 29 hommes en mourra (Brenner *et al.*, 2020). Cela représente en moyenne 4 200 hommes succombant à ce cancer chaque année, soit 9,5 % de tous les décès par cancer chez l'homme (Brenner *et al.*, 2020). De plus, il est à noter que le taux de mortalité est en diminution constante depuis la fin des années 1990 (Figure 6). Cette diminution est attribuable à une détection plus précoce de la maladie et à l'amélioration des traitements (Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer, 2019).

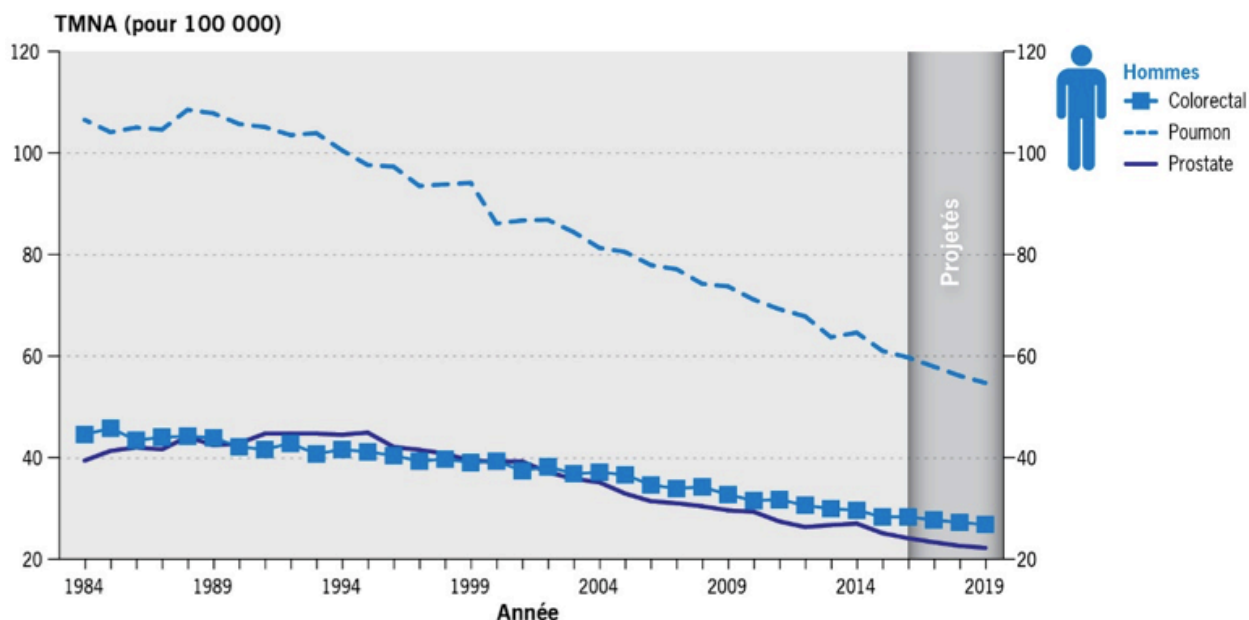


Figure 6: Taux de mortalité normalisés selon l'âge (TMNA) des trois cancers les plus mortels chez les hommes au Canada, 1984 à 2019.

Données provenant de (Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer, 2019).

En résumé, chaque jour, en moyenne 64 Canadiens recevront un diagnostic de cancer de la prostate tandis que 11 en mourront. En dépit de ces chiffres pouvant sembler impressionnants, il est important de noter que les cancers peuvent être divisés en deux catégories : ceux à progression lente et ceux plus agressifs. La majorité des cancers de la prostate, au moment du diagnostic, vont appartenir à la première catégorie bien que certains d'entre eux puissent ensuite évoluer vers une forme plus agressive. Ceci se reflète sur la survie nette qui atteint 93 %, au Canada, 5 ans après le diagnostic (Brenner *et al.*, 2020).

1.3.2 Considérations cliniques du cancer de la prostate

1.3.2.1 Dépistage du cancer de la prostate

Le **toucher rectal** est généralement la première méthode employée pour le dépistage du cancer de la prostate. Il s'agit d'un examen physique simple et causant peu d'inconfort. Le médecin de famille palpe la prostate à travers la paroi rectale afin de détecter la présence éventuelle d'une bosse ou d'un durcissement de la prostate (F. Saad, McCormack, M., 2019). Ces données sont les premières qui permettent d'évaluer le développement de la maladie. Cependant, le toucher rectal a ses limites puisqu'il ne permet pas un examen de la prostate en entier. Il est nécessaire de compléter cette évaluation physique de la prostate par une prise de sang pour mesurer le taux d'APS.

L'antigène prostatique spécifique est une glycoprotéine produite par les cellules luminales de la prostate, elle est donc spécifique à cet organe (Balk *et al.*, 2003). Elle a pour fonction de liquéfier les substances qui constituent le sperme. La prostate sécrète des substances essentielles pour maintenir un environnement favorable à la survie des spermatozoïdes et donc contribue à la fertilité masculine (Balk *et al.*, 2003). Le taux d'APS mesuré dans le sang, par le biais d'une biopsie liquide, a tendance à augmenter chez les hommes de plus de 40 ans à cause de l'augmentation du volume de la prostate. En effet, plus il y a de cellules luminales dans la prostate et plus la production d'APS augmente, même en absence de cancer. En l'absence de pathologie, le taux d'APS se situe entre 0 et 4,0 ng/mL, les cellules normales ne laissant passer qu'une faible quantité d'APS dans le sang (F. Saad, McCormack, M., 2019). Étant donné que les cellules cancéreuses de la prostate prolifèrent de façon anarchique et incontrôlée une plus grande quantité d'APS sera produite et sera ainsi décelée dans le sang. Quatre données doivent être prises en compte afin d'améliorer sa précision : la densité de l'APS (volume de la prostate en fonction du taux de l'APS), la quantité d'APS libre par rapport à l'APS total (APS non lié à d'autres protéines dans le sang), la vélocité de l'APS (cinétique du taux de l'APS) et l'âge du patient (F. Saad, McCormack, M., 2019). Si aujourd'hui le test de l'APS est le meilleur test de dépistage pour le cancer de la prostate, il n'est pas parfait car il est à noter que l'APS est spécifique à la prostate et non au cancer de la prostate. De ce fait, un taux d'APS élevé est le signe de la présence d'une pathologie liée à la prostate.

La valeur de l'APS a un lien avec le pourcentage de la prévalence du cancer de la prostate (Figure 7). Avec des valeurs d'APS total inférieures à 7,0 ng/mL, la prévalence du cancer est inférieure à 25 % et il s'agit d'un stade très précoce et curable dans 80% des cas. Si les valeurs d'APS sont comprises entre 7,01 et 30 ng/mL alors la prévalence est d'environ 65 % et cela correspond à un stade précoce mais curable à 50 %. Pour une valeur d'APS comprise entre 30,01 et 100 ng/mL, la prévalence est de 90 % et il s'agit d'un stade avancé. Finalement, pour des valeurs supérieures à 100,01 ng/mL, la prévalence du cancer est de 100 % et cela signifie un stade tardif du cancer de la prostate (Figure 7).

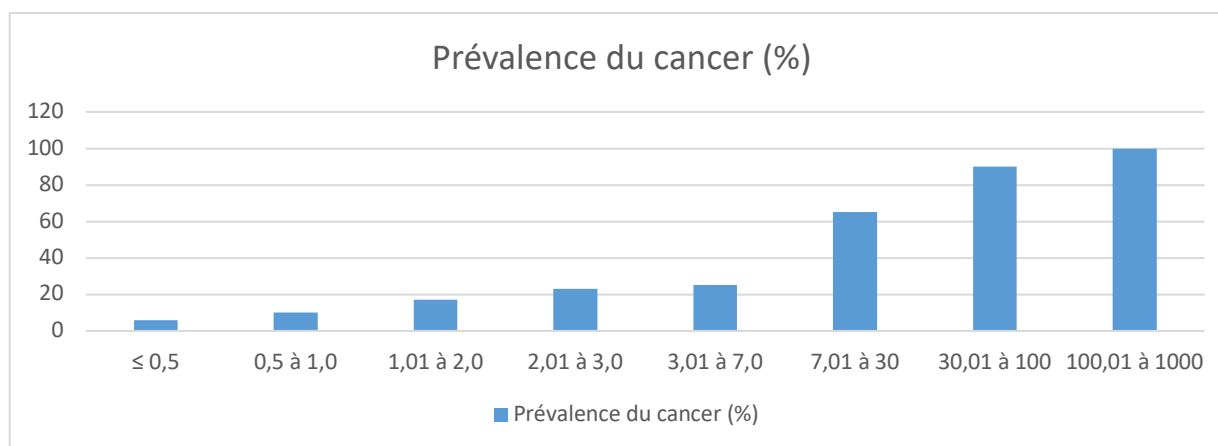


Figure 7: Histogramme de la correspondance de la valeur d'APS total en fonction de la prévalence du cancer de la prostate.

Chiffres extraits du site internet (www.arcagy.org/infocancer).

Afin d'avoir de meilleurs résultats et en connaissant les limites de ces différents tests, il est nécessaire qu'ils soient combinés pour améliorer l'exactitude du dépistage. À ce stade, l'utilisation de **nomogramme** va permettre de déterminer, pour chaque patient, la nécessité d'avoir recourt à la biopsie (Shariat *et al.*, 2009). Le nomogramme est un modèle statistique prédictif qui va inclure dans une équation les données disponibles du patient telles que son origine ethnique et son âge ainsi que les données cliniques disponibles telles que son taux d'APS et le résultat du toucher rectal (Eastham *et al.*, 1999) (Karakiewicz *et al.*, 2005). Pour chaque donnée, un nombre de points est attribué qui, additionnés, vont donner un score total, score qui va correspondre à une probabilité d'avoir un nombre de biopsies positives pour ce patient (Eastham *et al.*, 1999) (Karakiewicz *et al.*, 2005). Les nomogrammes peuvent aussi être utilisés à d'autres étapes de la prise en charge clinique du patient en ajoutant de nouvelles données d'entrées dans cette équation comme les éléments de classifications du cancer de la prostate décrits par la suite dans cette thèse (Garzotto *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2001) (Chun *et al.*, 2006). Ces nomogrammes peuvent alors permettre de déterminer les probabilités d'une rechute biochimique et de préciser l'agressivité du cancer.

Actuellement, il est recommandé aux hommes de plus de 50 ans de faire régulièrement un dépistage et de discuter avec leur médecin de famille des risques de cancer de la prostate. Si le médecin de famille note une suspicion alors il dirigera le patient vers un urologue.

1.3.2.2 Diagnostic du cancer de la prostate

En présence d'un toucher rectal suspect et d'un taux d'APS augmenté, et afin de poser un diagnostic plus précis, il sera nécessaire que le patient fasse une échographie transrectale accompagnée d'une biopsie.

L'**échographie transrectale** est pratiquée en insérant dans le rectum un instrument muni d'une aiguille de biopsie qui produit des ondes sonores de haute fréquence dirigées vers la prostate. À partir de ces ondes sonores, une image des structures du corps va être extrapolée. Cet examen permet dans un premier temps d'obtenir la mesure du volume de la prostate ainsi que de déceler d'éventuelles zones anormales, qui feront l'objet d'une biopsie (F. Saad, McCormack, M., 2019).

La **biopsie** s'effectue à l'aide d'une aiguille qui va percer la paroi du rectum afin d'accéder à la prostate et de réaliser le prélèvement des tissus et des cellules. En général, une collecte de 6 à 12 biopsies est effectuée dans les différentes zones de la prostate accessibles par le rectum (F. Saad, McCormack, M., 2019). Les échantillons seront analysés par un pathologiste qui déterminera si les tissus présentent une anomalie cancéreuse. Le rapport de pathologie va également préciser le grade de Gleason (voir partie 1.3.2.4) qui va permettre d'évaluer l'agressivité du cancer et donc d'orienter l'urologue vers le traitement le mieux adapté pour le patient (Epstein *et al.*, 2016).

1.3.2.3 Examens complémentaires du cancer de la prostate

A ces tests de diagnostic et de dépistage, il peut y avoir ajout d'examens complémentaires pour améliorer le diagnostic parmi lesquels se trouvent les nouvelles technologies d'imagerie. Ces examens complémentaires sont surtout réalisés chez les hommes qui présentent une bosse ou un durcissement étendu dans la prostate ou un taux d'APS élevé (F. Saad, McCormack, M., 2019).

La **tomodensitométrie axiale** (CT-scan) est un examen radiographique permettant de générer une image précise pour déterminer la dissémination du cancer aux ganglions et à d'autres parties du corps (F. Saad, McCormack, M., 2019).

La **tomographie par émission de positrons à l'antigène membranaire prostatique spécifique** (PET au PSMA) est une autre technique d'imagerie médicale. Pour réaliser cet examen, il est nécessaire d'injecter dans le corps du patient un produit radioactif qui permettra de visualiser spécifiquement les cellules cancéreuses d'origine prostatique par la mesure de la radioactivité émise. Ce produit va cibler le PSMA, un antigène membranaire spécifique de la prostate qui est plus abondamment produit par les

cellules cancéreuses que par les cellules normales. Cela permet donc aux médecins d'avoir des précisions concernant l'étendue de la maladie dans l'ensemble des organes du patient. Néanmoins, cet examen, qui est encore considéré comme expérimental, n'est pas utilisé en routine (F. Saad, McCormack, M., 2019).

Finalement, **l'imagerie par résonance magnétique multiparamétrique** (IRM multiparamétrique) est une technique d'imagerie radiologique utilisant des forces magnétiques pour produire des images 3D de la prostate et des tissus voisins. Cet examen est en constante évolution et il semble qu'à l'avenir, il soit de plus en plus utilisé pour le diagnostic et le suivi d'un cancer de la prostate (F. Saad, McCormack, M., 2019).

1.3.2.4 Classification du cancer de la prostate

Comme vu précédemment, la prise en charge thérapeutique des patients dépend en grande partie du degré de progression du cancer de la prostate. Cette progression est évaluée en fonction du grade et du stade de la maladie. Ces deux paramètres vont préciser l'état du cancer pour chaque patient au moment du diagnostic et permettre une meilleure planification du traitement. Ils vont donner une idée de la rapidité à laquelle le cancer peut se développer et de la probabilité de son évolution vers une forme plus agressive (F. Saad, McCormack, M., 2019).

Le grade, obtenu par le pathologiste qui examinera au microscope les biopsies prélevées (grade clinique) ou la prostate au complet (grade pathologique) dans le cas d'une prostatectomie, décrit l'apparence et l'agressivité des cellules cancéreuses. Cette classification histologique est basée sur le degré de différenciation des cellules cancéreuses et fait appel à l'échelle de Gleason (Epstein *et al.*, 2016). Cette échelle, qui a été créée en 1966 par le Dr. Donald F Gleason (Bailar *et al.*, 1966), est actuellement utilisée pour l'évaluation de plusieurs types de cancers (Figure 8). Elle est subdivisée en 5 échelons. Plus le numéro de l'échelon est petit, plus l'apparence des cellules cancéreuses est similaire à celle des cellules normales. Plus le numéro de l'échelon est proche de 5, plus l'apparence des cellules cancéreuses va être irrégulière et anormale (Epstein *et al.*, 2016). Les grades 1 et 2 sont habituellement peu trouvés lors du diagnostic, car présents chez des patients ne subissant que très rarement des biopsies. Les cellules présentant ce degré de différenciation ont une très forte ressemblance avec les cellules normales, ce qui suggère une progression très lente de la maladie. Les grades 3, 4 et 5 sont en lien avec des cellules plus indifférenciées et donc suggérant un cancer plus agressif (Gordetsky *et al.*, 2016).

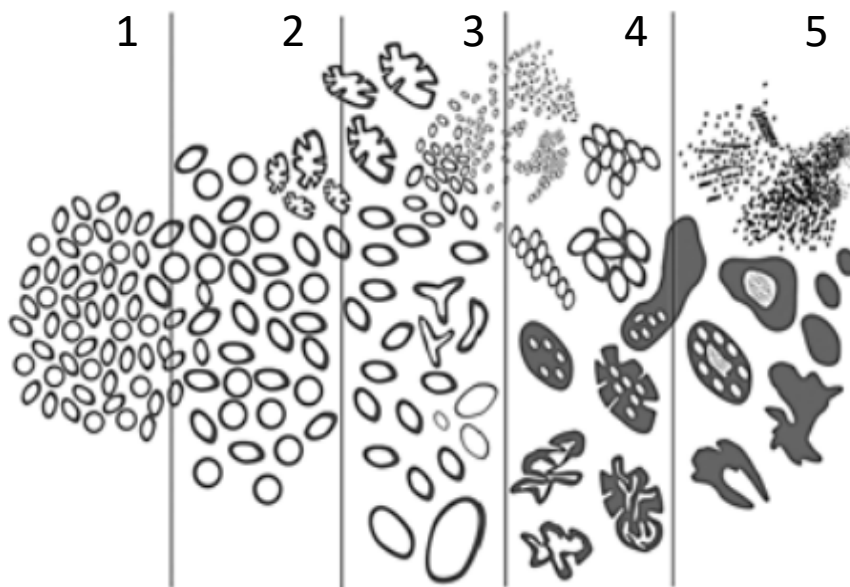


Figure 8: Profils histologiques schématisés de l'adénocarcinome prostatique de 2015 modifiés de la Société internationale de pathologie urologique.

Provenant de (Epstein *et al.*, 2016).

Comme le cancer de la prostate est hétérogène, le degré de différenciation peut varier en fonction des zones du tissu prélevé. Par conséquent, le pathologiste va déterminer les deux grades les plus présents (le grade primaire et le grade secondaire), afin d'obtenir, en additionnant ces deux valeurs, un **score de Gleason**. Dans l'optique d'en faciliter la compréhension, les pathologistes ont conçu un système de groupes de grade (Epstein *et al.*, 2016) (Gordetsky *et al.*, 2016), qui attribue un numéro entre 1 et 5 à un cancer de la prostate selon le score de Gleason obtenu (Tableau 1).

Tableau 1 : Définition histologique du nouveau système de classification des groupes de grade.

Groupe de grade	Score de Gleason	Interprétation
1	3 + 3 = 6 ou moins de 6	Risque bas : cancer à développement lent et ne nécessitant souvent aucun traitement
2	3 + 4 = 7	Risque intermédiaire bas : cancer à développement lent et ne nécessitant parfois aucun traitement
3	4 + 3 = 7	Risque intermédiaire élevé : cancer à développement modéré et nécessitant habituellement un traitement
4	8	Risque élevé : cancer à développement rapide avec un risque de propagation et nécessitant un traitement
5	9 ou 10	Risque très élevé : cancer à développement très rapide avec un fort risque de propagation et un mauvais pronostic et nécessitant un traitement

Le stade décrit la dissémination des cellules cancéreuses en faisant référence au degré de propagation de la maladie dans et hors de la prostate (Srigley *et al.*, 2019). Il s'agit du système de classification TNM basé sur 3 éléments : Tumeur, Ganglions pelviens (Nodes) et Métastases (**Tableau 2**) (Cheng *et al.*, 2012). Ce système a été développé pour la première fois par Dr. Pierre Denoix dans les années 1950 (Denoix, 1952). Lors des premiers stades de la maladie, le cancer est confiné à la prostate (Stade I ou II: T1 ou T2, N0, M0). Dans les stades intermédiaires, la maladie commence à s'étendre au-delà de la prostate (Stade III : T3 et T4, N0, M0) (**Figure 9**). Puis, pour les stades les plus avancés de la maladie, le cancer se propage aux ganglions pelviens et/ou à d'autres organes/tissus (Stade IV : T1/2/3/4, N1, M0 et T1/2/3/4, N0, M1) (Cheng *et al.*, 2012).

Tableau 2: Définition du système de classification du stade de la progression de la maladie.

Classification TNM	Classification	Interprétation
Tumeur primitive (Tumor)	Fait référence à l'étendue de la tumeur dans la prostate elle-même (envahissement local)	
	T1	La tumeur est confinée à la prostate et elle est détectable lors du test d'APS
	T2	La tumeur est locale mais palpable lors du toucher rectal
	T3	La tumeur dépasse les limites de la prostate
	T4	La tumeur a atteint des structures et des tissus voisins
Ganglions lymphatiques régionaux (Node)	Fait référence au degré de propagation aux ganglions pelviens en prenant en compte la taille et le nombre de ganglions atteints	
	N0	Aucune trace de tumeur dans les ganglions voisins
	N1, N2 et N3	Un ou plusieurs ganglions régionaux sont atteints par la tumeur
Métastases (Metastasis)	Fait référence à la propagation du cancer à d'autres parties du corps	
	M0	Aucune trace de cellules cancéreuses au-delà des ganglions
	M1	Le cancer s'est propagé à une ou à plusieurs parties du corps

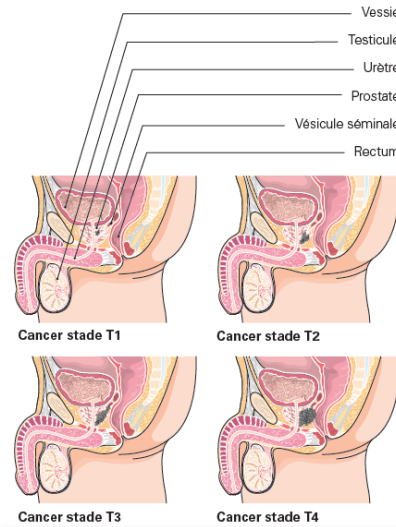


Figure 9: Les différents stades du cancer de la prostate.

Les zones en gris représentent la présence des cellules cancéreuses. Provenant de (F. Saad, McCormack, M., 2019).

1.3.3 Traitements et évolution du cancer de la prostate

L'approche thérapeutique adaptée à chaque patient est déterminée en se basant sur les outils de dépistage et de diagnostic, ainsi que sur l'âge du patient, son état de santé général, ses antécédents médicaux et ses préférences personnelles. En soit, la réflexion sur le choix du traitement à prescrire doit être effectuée avec le patient atteint d'un cancer de la prostate (F. Saad, McCormack, M., 2019). Cependant, il existe quelques lignes directives à suivre en fonction du niveau de progression du cancer de la prostate (Figure 10) (George, 2013). Chaque traitement est développé plus en détails dans les prochaines parties de cette thèse.

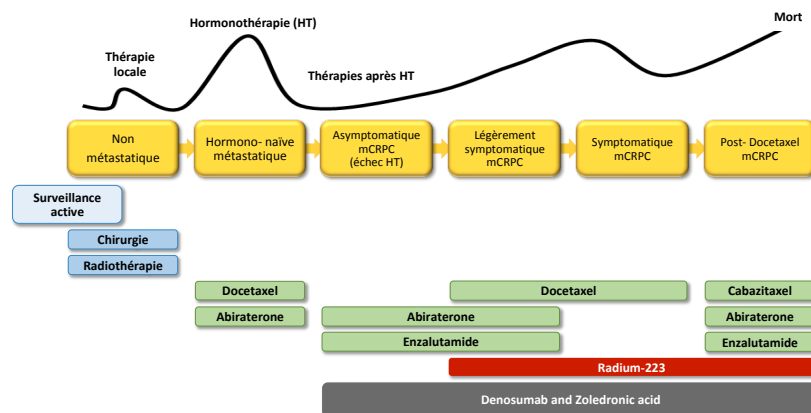


Figure 10: Illustration des lignes directrices des traitements en fonction de la progression du cancer de la prostate.
Adaptée de (Heidenreich *et al.*, 2013).

À titre d'exemple, pour un patient présentant un cancer à un stade de développement précoce, il peut être envisagé une approche de surveillance active. Pour un patient présentant un cancer de la prostate localisé et non métastatique, les options de traitements à privilégier sont la chirurgie ou la radiothérapie. Si le cancer récidive après ces traitements de première ligne, il lui sera recommandé de faire de l'hormonothérapie. Ce traitement aidera à contrôler la maladie mais la grande majorité des patients vont récidiver une seconde fois en développant une résistance à l'hormonothérapie accompagnée souvent de l'apparition de métastases à distance. Chez ces patients, il sera nécessaire d'avoir recours à des traitements par hormonothérapie de seconde génération couplés à de la chimiothérapie. Finalement, pour les patients à des stades bien plus avancés de la maladie, seul le recours à des traitements palliatifs visant à diminuer la douleur liée à la présence de métastases, est possible.

1.3.3.1 Surveillance active

La surveillance active, bien qu'il ne s'agisse pas d'un traitement en soi, peut être proposée à des patients qui sont en bonne santé et qui présentent un cancer à un stade de développement précoce (F. Saad, McCormack, M., 2019). Il s'agit du suivi actif et régulier de l'évolution des symptômes cliniques du patient avec, tous les trois à six mois, un toucher rectal, un test d'APS et plusieurs biopsies de la prostate. Ce suivi permettra de déceler la présence de signes indiquant l'évolution du cancer. Si le médecin remarque une progression trop rapide, il sera proposé au patient une intervention thérapeutique telle que la chirurgie ou la radiothérapie. Il est à noter que moins de la moitié des patients sous surveillance

active (de 25 à 50 %) devront un jour avoir recours à un traitement en raison de la progression de leur cancer (F. Saad, McCormack, M., 2019).

1.3.3.2 Traitements de première ligne

Les traitements de première ligne du cancer de la prostate sont la chirurgie et la radiothérapie. Ce sont des thérapies locales qui s'adressent à des patients présentant des stades de développement précoces de la maladie et un cancer strictement confiné à la prostate.

La chirurgie qui est la plus couramment proposée est la **prostatectomie radicale**. La prostatectomie radicale consiste en l'ablation complète de la prostate, d'une partie des tissus environnants et des vésicules séminales. Après examen des spécimens prostatiques recueillis durant la prostatectomie radicale, le stade est réévalué à la hausse dans 1/3 des cas. L'analyse pathologique du tissu réséqué permet aussi de déterminer l'étendue de la dissémination des cellules cancéreuses dans la prostate. S'il y a franchissement des limites anatomiques de la capsule prostatique par des cellules cancéreuses, voir même seulement atteinte de ces limites, le pathologiste va établir que les marges de résection sont positives (Voges *et al.*, 1992). La présence de ces marges positives suggère fortement au chirurgien que des cellules tumorales résiduelles sont encore présentes chez le patient et ce même après la prostatectomie radicale. Outre le stade du cancer de la prostate, une mauvaise exécution de la prostatectomie radicale peut également être à l'origine de marges positives et ainsi augmenter le risque de récurrence du cancer pour le patient (Swindle *et al.*, 2005) (L. Zhang *et al.*, 2018). Les patients devront effectuer, après la chirurgie, des examens de routine tous les trois à six mois pendant une période totale de deux à trois ans. Si tous les résultats sont normaux alors les examens deviendront des rendez-vous annuels. Durant ces examens de routine, il sera principalement fait une prise de sang afin de suivre le taux d'APS. Normalement, après l'opération la concentration sanguine d'APS devrait être indétectable puisque les cellules épithéliales prostatiques ne sont, en théorie, plus présentes pour la produire. L'augmentation du taux de l'APS est le premier signe de progression du cancer de la prostate. La rechute biochimique est définie avec une augmentation égale ou supérieure à 0,2 ng/mL. Une augmentation supérieure à 0,4 ng/mL est caractéristique d'une progression du cancer vers une maladie métastatique (Tourinho-Barbosa *et al.*, 2018). Lors d'une rechute biochimique le médecin va privilégier une radiothérapie qui sera combinée avec l'hormonothérapie dans le cas d'une maladie métastatique. Il est à noter que le traitement localisé par prostatectomie radicale est souvent curatif, cependant approximativement 30 % des patients vont avoir une rechute biochimique (Freedland *et al.*, 2005; Kolodziej, 2014; Lin *et al.*, 2019).

Habituellement, cette dernière survient entre une et quatre années après le traitement initial. Après 5 ans sans rechute biochimique, le patient est en période de rémission et son risque de récurrence devient alors très faible (F. Saad, McCormack, M., 2019).

Le second traitement de première ligne est **la radiothérapie** qui peut être externe ou interne. La radiothérapie externe est basée sur l'utilisation de faisceaux à haute énergie tels que des rayons X ou des protons. Les faisceaux vont endommager l'ADN des cellules afin d'entraîner leur mort au moment de la division cellulaire et/ou le ralentissement de leur prolifération. Bien que le rayonnement soit également toxique pour les cellules saines, les cellules cancéreuses se multipliant plus rapidement que les cellules normales, elles sont donc plus vulnérables à ce traitement. En raison même de son mode d'action, la radiothérapie peut aussi être bénéfique pour les patients atteints d'un cancer avancé ayant récidivé. La radiothérapie peut être combinée avec des images de CT-scan, TEP et/ou IRM afin de réduire au maximum l'exposition des cellules saines aux rayonnements. **La curiethérapie**, la radiothérapie interne, utilise de petits implants radioactifs qui sont placés dans la prostate lors d'une intervention chirurgicale. Il y a deux approches possibles à la curiethérapie : à faible ou à fort débit (Skowronek, 2013). Pour la première, de petits implants émettant de faibles doses de rayonnement pendant plusieurs semaines ou mois sont placés dans la prostate. Les sources peuvent émettre une grande quantité de rayonnement dans une très petite zone afin de limiter la quantité de dommages aux tissus sains à proximité. À l'inverse, la curiethérapie à fort débit utilise des implants qui émettent de fortes doses de rayonnements et qui seront mis en place seulement pendant quelques minutes. Cette technique nécessite d'effectuer plusieurs expositions étalées sur plusieurs jours. Il est à noter qu'environ 40 % des patients traités par radiothérapie vont avoir une rechute biochimique dans les 10 ans post-thérapie (Kupelian *et al.*, 2006) (Lin *et al.*, 2019).

Quelle que soit la thérapie de première ligne utilisée, la rechute biochimique chez un patient est associée avec une augmentation du risque de développer des métastases (Boorjian *et al.*, 2011) (Lin *et al.*, 2019) puisque 34% des patients développeront des métastases huit ans après leur rechute biochimique (Pound *et al.*, 1999).

1.3.3.3 Traitements de seconde ligne

Les traitements de seconde ligne sont l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Ces traitements sont utilisés chez des patients qui présentent un cancer localisé qui a récidivé après les traitements de première

ligne mais aussi chez ceux avec un cancer localisé avancé sans métastases, un cancer qui a développé des métastases ou un cancer récidivant malgré l'hormonothérapie (avec ou sans métastases).

Au début des années 1940, le Dr Huggins a établi que les cellules cancéreuses prostatiques sont dépendantes des androgènes pour leur croissance et leur survie (Huggins *et al.*, 1941). C'est suite à cette importante découverte scientifique que l'utilisation de **l'hormonothérapie**, aussi appelée thérapie par privation androgénique, a commencé à être utilisée pour le traitement du cancer de la prostate. Les androgènes sont requis pour le développement de la prostate et sa fonction prostatique normale (Heinlein *et al.*, 2004). Comme vu précédemment, les androgènes sont composés à 90 % de testostérone, cela l'identifie comme une excellente cible thérapeutique (Dai *et al.*, 2017).

Le but de l'hormonothérapie consiste à empêcher l'activation du récepteur aux androgènes (AR) des cellules cancéreuses en réduisant les niveaux d'androgènes ou en bloquant l'action de ces hormones. De ce fait, l'hormonothérapie permet de ralentir ou de réduire la croissance tumorale dans la prostate (Heinlein *et al.*, 2004). Néanmoins, à plus ou moins long terme, le cancer de la prostate va progresser d'un état androgéno-sensible à un état androgéno-résistant (également appelé résistant à la castration), un phénomène qui serait peut-être dû à l'apparition de cellules androgéno-indépendantes au cours du développement de la tumeur, parfois avant même l'utilisation de traitements par hormonothérapie (Heinlein *et al.*, 2004) (Bellmunt *et al.*, 2010).

Pour le premier type d'hormonothérapie, il y a utilisation d'un analogue de la LH-RH qui permet d'arrêter la production de LH par l'hypophyse. L'analogue le plus couramment utilisé est le Leuprolide (Lupron). Il y a aussi utilisation d'inhibiteurs de la synthèse d'androgène, de petites molécules de seconde génération telles que l'Abiratérone (Zytiga), qui bloquent la production d'androgènes par les testicules (F. Saad *et al.*, 2015). Pour le second type d'hormonothérapie, il s'agit de thérapies qui agissent directement sur le AR pour l'empêcher de fonctionner, et donc limiter la croissance et la survie des cellules cancéreuses de la prostate. Les thérapies anti-androgènes de ce type disponibles sont l'Apalutamide (Erleada), le Bicalutamide (Casodex) et l'Enzalutamide (Xtandi) (F. Saad *et al.*, 2015).

Il est à noter que l'utilisation de l'hormonothérapie vise principalement à maîtriser le développement de la maladie pour permettre aux patients de vivre plus longtemps tout en conservant une bonne qualité de vie. L'hormonothérapie peut également être utilisée avant la radiothérapie ou la chirurgie afin de réduire le volume tumoral (Forster *et al.*, 2002). Il peut aussi être envisagé de l'utiliser conjointement avec la radiothérapie comme traitement initial ou en cas de maladie récurrente. Dans le

cas de cancer avancé, l'option thérapeutique la plus optimale est l'hormonothérapie (Rhee *et al.*, 2015; F. Saad *et al.*, 2015; F. Saad, McCormack, M., 2019; Sountoulides *et al.*, 2013). En moyenne 80 % des patients répondront de façon efficace à l'hormonothérapie. Néanmoins, tous les patients finiront par développer une résistance à la castration. Chez ces patients, seule le recours à la chimiothérapie est possible (F. Saad *et al.*, 2015; F. Saad, McCormack, M., 2019).

La chimiothérapie standard donnée aux patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique ne répondant plus à l'hormonothérapie, est le taxane. Il s'agit d'un traitement intraveineux dont le nombre d'injections, effectuées aux trois semaines et appelées cycles, varie en fonction de la tolérance et de la réponse du patient. En général, il y a prescription de six à dix cycles. L'évaluation de l'efficacité d'un traitement de chimiothérapie se fait en suivant le taux d'APS sanguins du patient et en contrôlant que les symptômes liés à la maladie sont en diminution. Les taxanes sont des antimétoproliques qui vont perturber la dépolymérisation des microtubules nécessaire à la division cellulaire et donc diminuer la prolifération des cellules cancéreuses. Le Docétaxel a été le premier agent taxane approuvé pour le traitement des cancers de la prostate métastatiques résistants à la castration. Depuis 2010, d'autres chimiothérapies ont été approuvées pour ce cancer telles que le Cabazitaxel qui peut être utilisé comme seconde ligne de traitement de chimiothérapie. Il faut rappeler qu'un grand nombre d'effets secondaires sont associés à l'utilisation de ces chimiothérapies dont les plus courants sont la perte de cheveux, les nausées, la fatigue et un affaiblissement du système immunitaire (Sperlich *et al.*, 2013).

Lorsque les patients ont un cancer de la prostate résistant à la castration, ils vont développer des métastases qui s'implanteront, le plus souvent, dans les os et qui sont donc qualifiées de métastases osseuses. Il est alors préférable d'avoir recours à des **traitements ciblant la réduction des complications osseuses** (Rhee *et al.*, 2015; F. Saad *et al.*, 2015; Sountoulides *et al.*, 2013). Les os contiennent deux types de cellules : les ostéoclastes qui détruisent le tissu osseux vieillissant et les ostéoblastes qui reconstruisent ce tissu. Ces processus de formation et de résorption sont dans un équilibre qui maintient la croissance de l'os. Cependant certaines métastases, comme celles du cancer de la prostate, vont perturber cet équilibre en favorisant la croissance des ostéoblastes et donc une fragilisation de l'os. De ce fait, il s'agit de traitements de soutien, qui n'ont pas vocation à éliminer le cancer mais qui ont pour but de prolonger la vie des patients tout en leur assurant une qualité de vie convenable. Ces traitements ralentissent la croissance des métastases sans pour autant détruire toutes les cellules métastatiques. Parmi ces traitements, il y a le radium-223 (Xofigo), un agent radioactif administré par voie intraveineuse, qui va se fixer sur les os et émettre des rayons pour affaiblir les cellules cancéreuses. Il existe également des

traitements à base de bisphosphonates tels que l'acide zolédronique (Zometa) renforçant les os affaiblis par le cancer et soulageant les douleurs osseuses du patient (F. Saad, 2003). À ceux-ci s'ajoute l'utilisation de l'anticorps monoclonal Denosumab (Xgeva) qui a pour cible RANKL (de l'anglais *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*). Ce traitement permet de diminuer les risques de complications en agissant directement sur les ostéoblastes pour solidifier l'os (M. R. Smith *et al.*, 2009) (M. R. Smith *et al.*, 2015). Une fois les premières métastases apparues, l'espérance de vie du patient est en moyenne de cinq ans (Pound *et al.*, 1999).

Avec le développement des recherches sur le cancer de la prostate, de plus en plus de traitements sont disponibles, mais afin d'éviter le développement de résistances (Agarwal *et al.*, 2016; Hwang, 2012), il est nécessaire de pouvoir faire une meilleure identification des patients répondant spécifiquement à chaque traitement. Pour cela, et depuis plusieurs années, de nombreuses études s'intéressent au potentiel des biomarqueurs pour prédire l'évolution de la maladie, la réponse aux traitements voire la prédisposition à développer rapidement une résistance à des traitements spécifiques.

1.4 L'utilisation de biomarqueurs

En 1998, le groupe de travail de définition des biomarqueurs du NIH (de l'anglais *National Institutes of Health*) définit un biomarqueur (aussi appelé marqueur biologique) comme « une caractéristique qui est objectivement mesurable et évaluable comme un indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou lors de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » (Biomarkers Definitions Working, 2001). Ces mesures et évaluations doivent être faites avec précision et reproductibilité. D'un point de vue clinique, le biomarqueur est une caractéristique variable qui reflète de la meilleure façon l'état d'un patient (Biomarkers Definitions Working, 2001). Ces caractéristiques variables peuvent être divisées en quatre types d'utilisations (Biomarkers Definitions Working, 2001) (Kulasingam *et al.*, 2008):

- outil de diagnostic pour détecter et identifier des patients atteints d'une maladie ou présentant un état anormal. Ces biomarqueurs doivent présenter une grande spécificité et sensibilité,
- outil de stratification de la maladie ou de classification de l'étendue de la maladie,
- outil de pronostic pour prédire l'évolution probable de la maladie,
- outil thérapeutique pour prédire la réponse à un traitement avant le début de ce dernier ou pour le suivi de la réponse clinique à la suite d'une intervention.

Le biomarqueur peut sur du long terme finir par remplacer un critère clinique s'il prédit le bénéfice

ou le préjudice pour les patients en se basant sur des données épidémiologiques, thérapeutiques, physiologiques et sur d'autres preuves scientifiques (Biomarkers Definitions Working, 2001). Les biomarqueurs peuvent être présents naturellement dans l'organisme, être produits par l'hôte en réponse à la présence de cellules cancéreuses ou bien être exprimés ou sécrétés par les cellules cancéreuses elles-mêmes (Srinivas *et al.*, 2001). De ce fait, les biomarqueurs peuvent être détectés dans les divers liquides de l'organisme (sang, urine, liquide cérébro-spinal, salive), dans diverses cellules ou encore dans les tissus. Les biomarqueurs couramment utilisés en clinique peuvent être de plusieurs types : ADN, ARN, protéines et métabolites (Hayes *et al.*, 1996). L'utilisation de nouvelles technologies, comme le séquençage à haut débit, a eu un impact majeur sur la découverte de nouveaux oncogènes et de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs.

Le développement de biomarqueurs passe par cinq phases pour aboutir à une utilisation en clinique (Pepe *et al.*, 2001) : 1) études exploratoires précliniques, 2) développement et validation de tests cliniques, 3) études longitudinales rétrospectives, 4) études lors de dépistages prospectifs, et 5) essais cliniques randomisés (Mayeux, 2004).

Les avantages de l'utilisation de biomarqueurs sont les suivants : réalisation d'une évaluation objective, quantification continue, résultats reproductibles, précision des résultats et étude des mécanismes de la maladie (Mayeux, 2004). Cependant, leurs utilisations comportent des inconvénients qui comprennent de longues validations qui peuvent être coûteuses et des difficultés à établir des seuils de positivité représentatifs de toutes les situations (Mayeux, 2004). Les échecs du développement de ces biomarqueurs sont majoritairement liés à l'utilisation de cohortes contenant des échantillons qui n'ont pas été adéquatement conservés. De plus, ces cohortes regroupent habituellement un petit nombre de patients (inférieur à 100), sont peu représentatives de l'hétérogénéité d'un cancer spécifique, et proviennent d'un seul centre clinique. Néanmoins, l'accès aux échantillons biologiques par l'intermédiaire de biobanques permet de plus en plus d'augmenter ce nombre de patients pour chaque cohorte et également de faire des regroupements d'échantillons provenant de plusieurs centres cliniques. De plus, les biobanques permettent de faire une harmonisation des procédures de conservation et donc de diminuer les altérations possibles des échantillons. Ces améliorations visent à rendre les études de biomarqueurs de plus en plus pertinentes.

1.4.1 Synthèse des biomarqueurs étudiés en cancer de la prostate

De nombreux biomarqueurs moléculaires du cancer de la prostate ont été identifiés; cependant seuls quelques-uns ont été approuvés par la FDA (de l'anglais *Food Drug Administration*) (Kohaar *et al.*, 2019).

1.4.1.1 Biomarqueurs approuvés par la FDA pour le cancer de la prostate

En clinique, le **biomarqueur sanguin APS** a été une découverte significative du 20ème siècle. Le Dr. T Ming Chu et ses collègues ont été les premiers à purifier et caractériser l'APS et à montrer que son expression est spécifique aux cellules épithéliales de la prostate (M. C. Wang *et al.*, 1979). Le test de l'APS a été initialement approuvé par la FDA en 1986 pour surveiller la progression du cancer de la prostate chez les hommes qui avaient déjà été diagnostiqués. Une étude a mis en évidence que le test sérique de l'APS, en combinaison avec le toucher rectal, améliore également le diagnostic du cancer de la prostate (Catalona *et al.*, 1991). De ce fait, la FDA a approuvé l'utilisation de cette combinaison de tests en 1994. L'APS est désormais identifié comme le biomarqueur protéique le plus représentatif pour aider au dépistage et au suivi d'un patient atteint d'un cancer de la prostate. Ce dosage a considérablement contribué à la détection et au traitement précoce des patients ce qui a conduit à une forte baisse de la mortalité liée à ce cancer au cours des dernières décennies (Etzioni *et al.*, 2008) (Polascik *et al.*, 1999). Néanmoins, comme évoqué plus tôt, le taux d'APS n'est pas spécifique à la présence du cancer de la prostate mais plus à l'activité de l'ensemble des cellules prostatiques (Thompson *et al.*, 2004). De ce fait, une augmentation du taux d'APS peut aussi correspondre à une pathologie non cancéreuse telle que la prostatite ou l'hyperplasie bénigne de la prostate (Djavan *et al.*, 2000) (Vickers *et al.*, 2008). De plus, l'utilisation de l'APS seul peut mener à des sur ou des sous traitements et il ne permet pas la distinction entre les maladies à faible et à haut risque (Barry, 2001).

En 2012, la FDA a approuvé le **biomarqueur urinaire antigène 3 du cancer de la prostate (PCA3) (Progensia)** qui est commercialisé par Hologic. PCA3 a été découvert par l'analyse du transcriptome de tissus tumoraux de la prostate (Bussemakers *et al.*, 1999). Plusieurs études ont montré que PCA3 est surexprimé chez des patients atteints d'un cancer de la prostate (Petrovics *et al.*, 2005) (Schalken *et al.*, 2003). Plus spécifiquement, ce test a été approuvé pour une utilisation chez les hommes de plus de 50 ans présentant un taux d'APS élevé et un résultat de biopsies négatif (Groskopf *et al.*, 2006). Dans cette étude, les auteurs établissent un score de PCA3 qui reflète le ratio entre les molécules d'ARN de PCA3 et celles d'APS détectées dans l'échantillon d'urine d'un patient prélevé après un toucher rectal (Groskopf *et al.*, 2006).

Finalement, le **test pronostique ProMark® de biomarqueurs tissulaires** est actuellement

commercialisé par Metamark. Ce test est réalisé sur des coupes de biopsies pour lesquelles le pathologiste a identifié un score de Gleason de 3+3 ou de 3+4 (Blume-Jensen *et al.*, 2015). Il vise à prédire la progression de la maladie vers une maladie à hauts risques. Il permet la quantification de l'expression de huit protéines (DERL1, CUL2, FUS, HSPA9, PDSS2, pS6, SMAD4 et YBX1) par immunofluorescence (Blume-Jensen *et al.*, 2015). Ces huit protéines ont été sélectionnées à partir d'un panel de 160 candidats. Seules les protéines présentant le plus de robustesse (sensibilité et spécificité) et de reproductibilité dans leurs expressions durant les différents stades de la maladie ont été conservées. Ces protéines sont connues pour avoir des fonctions indépendantes dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la survie cellulaire et du métabolisme. La diversité de ces protéines permet de prédire assez finement les changements biologiques qui vont orienter le cancer vers une maladie à haut risque (Shipitsin *et al.*, 2014).

1.4.1.2 Biomarqueurs avec un potentiel pronostique du cancer de la prostate

Actuellement, en clinique, le nombre de biomarqueurs utilisés pour le diagnostic, le pronostic et la prédiction thérapeutique est faible. Toutefois, un grand nombre de biomarqueurs, seul ou en combinaison, visant à améliorer la stratification et la prévention des réponses aux traitements, suscitent de forts intérêts dans la communauté scientifique (Bickers *et al.*, 2009) (Esfahani *et al.*, 2015) (Esfahani *et al.*, 2015; Gaudreau *et al.*, 2016).

Le biomarqueur **α -methylacyl-CoA racemase (AMACR)** ou P504S est une enzyme qui joue un rôle dans le métabolisme mitochondrial oxydatif et dans la synthèse d'acides gras (Ferdinandusse *et al.*, 2000). L'utilisation du biomarqueur AMACR semble permettre d'identifier la présence de cellules cancéreuses prostatiques lors de marquage tissulaire. Cependant, une étude a rapporté que la diminution d'expression tissulaire de ce biomarqueur corrèle avec une augmentation du risque de rechute biochimique chez des patients mais aussi avec un mauvais pronostic pour des patients ayant développé des métastases (Rubin *et al.*, 2005). Ce changement de niveau d'expression rend ce biomarqueur intéressant pour le pronostic des patients avec un cancer de la prostate résistant à la castration (Beach *et al.*, 2002).

Le **biomarqueur KI-67** est une protéine nucléaire dont l'expression augmente quand les cellules se divisent. Ce marqueur de prolifération fait l'objet de nombreuses études au niveau de plusieurs cancers, incluant le cancer de la prostate. Sa forte expression dans les cellules épithéliales prostatiques cancéreuses semble prédire, indépendamment de tout autre marqueur, la rechute biochimique (Bettencourt *et al.*, 1996), le développement de métastases (Li, Heydon, *et al.*, 2004) et la mortalité spécifiquement liée à la maladie (Fisher *et al.*, 2013) chez les patients ayant déjà reçu un traitement de première ligne (Jhavar *et al.*, 2009) (Verhoven *et al.*, 2013). De plus, plusieurs études ont montré des

résultats prometteurs pour la prédiction de la rechute biochimique lorsqu'il est utilisé en combinaison avec les biomarqueurs CD34 (Bettencourt *et al.*, 1998), MDM2 (Khor *et al.*, 2009), PCNA (Zhong *et al.*, 2008) ou encore p53 (Verma *et al.*, 2015). Cependant, son utilisation seule en clinique pour le cancer de la prostate n'est pas recommandée par le réseau national de compréhension du cancer (NCCN, de l'anglais *National Comprehensive Cancer Network*) (Mohler *et al.*, 2016). Ce réseau a pris en compte les résultats spécifiques au cancer de la prostate, la présence d'essai clinique randomisé et la comparaison avec d'autres tests existants. En se basant sur ces critères, ce test moléculaire présente aucun essai clinique et KI-67 a été trouvé dans toutes les cellules cancéreuses, donc un résultat positif de KI-67 n'est pas forcément lié au suivi spécifique d'un cancer de la prostate.

La **protéine PTEN** (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 3-phosphatase) est un biomarqueur qui présente un grand potentiel pronostique. Elle est présente dans une grande majorité des cellules de l'organisme et contrôle la prolifération cellulaire. Différentes études ont rapporté la présence de PTEN autant au noyau (Chung *et al.*, 2005) qu'au cytoplasme des cellules cancéreuses (Denning *et al.*, 2007). Cependant, seule la perte de la localisation nucléaire de PTEN est liée à une augmentation des critères cliniques (score de Gleason, taux d'APS) chez les patients ayant une maladie à faible risque (Cuzick *et al.*, 2013). Son niveau d'expression a aussi été identifié comme pronostique pour des patients ayant eu une radiothérapie (Ramirez *et al.*, 2008). Toutefois, PTEN ne fait pas parti des recommandations par le NCCN pour une utilisation en clinique pour le cancer de la prostate (Mohler *et al.*, 2016) en raison de son expression dans toutes les cellules de l'organisme et de l'absence d'essai clinique pour ce test moléculaire. De ce fait, l'utilisation de PTEN comme biomarqueur ne peut pas être spécifique à la présence du cancer de la prostate.

Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) est une protéine impliquée dans le contrôle épigénétique de la différenciation et de la prolifération cellulaire. Une étude a montré qu'une augmentation des niveaux d'expression de EZH2 dans les cellules épithéliales prostatiques, au noyau et au cytoplasme, est en lien avec l'évolution de la maladie et il a été observé avec un accroissement significatif de son niveau d'expression entre les tumeurs bénignes, le NIP, les cancers de la prostate localisés et les cancers de la prostate métastatiques (Varambally *et al.*, 2002). Par ailleurs, de fortes expressions nucléaires de EZH2 chez les patients avec une maladie localisée corrélaient avec un mauvais pronostic (Varambally *et al.*, 2002). Ces résultats identifient ce biomarqueur comme un biomarqueur prometteur pour distinguer la maladie à faible risque par rapport à la maladie à haut risque (Varambally *et al.*, 2002). Également, ce biomarqueur a montré un intérêt pour l'identification précoce des patients présentant un potentiel métastatique (Labbe *et al.*, 2017). De plus, une récente étude a mis en évidence qu'une forte expression de EZH2 était

associée avec un risque accru de récurrence métastatique après la radiothérapie (X. Wu *et al.*, 2019).

La E-cadhérine (ECAD) est une glycoprotéine couramment utilisée comme biomarqueur pour le suivi du phénotype épithélial lors de la transition épithélio-mésenchymateuse. Plusieurs études dans le cancer de la prostate ont montré que la diminution de l'expression de ECAD dans les cellules cancéreuses est associée significativement avec la progression de la maladie (Umbas *et al.*, 1994) (Putzke *et al.*, 2011). De plus, l'utilisation de ce biomarqueur en combinaison avec EZH2 a permis de prédire le risque de réapparition de la maladie à la suite d'une prostatectomie radicale (Rhodes *et al.*, 2003).

Le **récepteur aux androgènes (AR) et son variant AR-V7** sont sans nul doute les biomarqueurs qui présentent actuellement le plus de potentiel dans le cancer de la prostate. Comme expliqué précédemment, le AR est un récepteur nucléaire activé principalement par les androgènes et est un facteur de transcription intervenant pour le maintien du phénotype masculin. Étant donné que les cellules prostatiques cancéreuses sont initialement hormono-dépendantes, le AR est grandement impliqué dans leur croissance et leur survie (Heinlein *et al.*, 2004). De hauts niveaux d'expression d'AR sont associés avec l'augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses, avec l'agressivité de la maladie et peuvent aussi prédire la rechute biochimique des patients indépendamment des données cliniques usuellement utilisées. Cela confirme le rôle du AR dans la croissance tumorale et dans la progression du cancer de la prostate (Li, Wheeler, *et al.*, 2004). Un groupe de chercheurs a mis en évidence que l'analyse combinée de l'expression du AR, de KI-67 et de p53 chez des patients après prostatectomie radicale est en mesure de prédire l'échec du traitement hormonal (Inoue *et al.*, 2005). Par la suite, l'identification de variants du AR a permis de démontrer le rôle des formes produites à la suite d'un épissage alternatif du AR dans le développement de la résistance à la castration. Il existe 4 formes mutées qui sont produites par épissage alternatif. Le AR-V7 en particulier, qui est une forme tronquée du AR, semble être un biomarqueur prédictif important chez les patients. Il est à ce titre suggéré que la mise en place d'un traitement ciblant spécifiquement ce variant permettra de prévenir la progression du cancer et ainsi améliorer la survie des patients (Qu *et al.*, 2015). D'autres études ont montré que des patients développant des métastases en lien avec leur cancer de la prostate ont une augmentation de l'expression de AR-V7 dans les cellules prostatiques, tout en maintenant un faible niveau d'expression d'APS. Ces résultats suggèrent que la thérapie qui vise la privation d'androgène augmente l'expression de AR-V7 et inhibe la production de l'APS (Hornberg *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été mis en évidence un potentiel effet des variants du AR sur la sensibilité aux chimiothérapies (Thadani-Mulero *et al.*, 2014). Plus précisément, l'accumulation de différents variants du AR dans les cellules cancéreuses résistantes à la castration affecterait l'efficacité anti-tumorale des traitements de types taxanes. Néanmoins, d'autres études ont montré que le variant

AR-V7 n'est pas impliqué dans l'apparition de ces résistances ce qui suggère que les patients présentant une expression de AR-V7 positive pourraient recevoir un traitement par chimiothérapie à base de taxane (Onstenk *et al.*, 2015) (Nakazawa *et al.*, 2015) alors que les patients AR-V7 négatifs seraient plus prédisposés à recevoir un traitement par hormonothérapie de seconde génération tel que l'Abiratérone ou l'Enzalutamide (Antonarakis *et al.*, 2014). Il a d'ailleurs été montré que si, chez un patient, les cellules tumorales circulantes expriment AR-V7, alors une résistance à ces deux hormonothérapies est à prévoir (Antonarakis *et al.*, 2014) (Steinestel *et al.*, 2015) (Bryce *et al.*, 2016).

La **protéine p53** a un rôle de suppresseur de tumeur, qui est une des principales barrières de la cellule contre le développement du cancer. Cette protéine est un facteur de transcription activé en réponse à pratiquement tous les signaux de stress associés au cancer et régule les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réponse aux dommages à l'ADN, l'apoptose et le métabolisme (Lu *et al.*, 2014). Cette protéine est la cible la plus fréquente de mutations non fonctionnelles dans les cancers humains. La forte expression de p53 par les cellules cancéreuses prostatiques est associée à un mauvais pronostic en terme de progression de la maladie et de survie des patients (Thomas *et al.*, 1993) (Petrescu *et al.*, 2006). De plus, le biomarqueur p53 semble être un indicateur pronostique indépendant des données cliniques pour l'apparition de métastases (Inoue *et al.*, 2005) (Grignon *et al.*, 1997). Aussi, la combinaison de l'expression de p53 et du proto-oncogène BCL-2 est un bon prédicteur de rechute biochimique pour les patients après prostatectomie radicale (Bauer *et al.*, 1996).

La **protéine p65** est connue pour être la principale sous-unité du facteur de transcription NF-kappa-B. Le complexe transcriptionnel NF-κB est essentiel pour la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires (Jimi *et al.*, 2005), dans la prolifération cellulaire, dans la tumorigénèse et dans la survie cellulaire (Hayden *et al.*, 2014). Cette protéine est à la fois suivie en tant que biomarqueur pour sa fréquence nucléaire et pour son niveau d'expression cytoplasmique (Gannon *et al.*, 2013). Notre laboratoire a mis en évidence la valeur pronostic de p65 en montrant que l'augmentation de la fréquence de localisation nucléaire de p65 est associée significativement avec la rechute biochimique (Lessard *et al.*, 2003) (Fradet *et al.*, 2004) (Gannon *et al.*, 2013) et avec le risque de progression de la maladie (Ismail *et al.*, 2004) (Lessard *et al.*, 2006) (Labouba *et al.*, 2015). Cette valeur pronostic de p65 a été récemment validée dans une étude rétrospective utilisant une grande cohorte multicentrique (Grosset *et al.*, 2019).

La **kinase IKKε** connue comme une protéine impliquée dans la voie NF-κB, contribue à la tumorigénèse et représente ainsi un lien entre l'inflammation et le cancer (Shen *et al.*, 2011). Dans le cancer de la prostate, la kinase IKKε peut être à la fois localisée au cytoplasme et au noyau (Peant *et al.*,

2011). Notre laboratoire a identifié qu'une augmentation de l'expression cytoplasmique de IKK ϵ corrélait significativement avec la progression de la maladie (Peant *et al.*, 2011). Cela a mis en évidence le potentiel rôle que IKK ϵ aurait dans le développement du cancer de la prostate.

La famille des récepteurs de facteur de croissance épidermique (ERBB) regroupe les protéines EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4 et semble impliquée dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate (Yao Huang, 2011). Ses membres sont donc de possibles biomarqueurs et cibles thérapeutiques pour le traitement de ce cancer. Les membres de la famille ERBB font l'objet d'une étude plus approfondie dans le cadre de ce projet de recherche de doctorat (voir partie 1.4.2.2).

La famille des protéines BCL-2 est divisée en deux sous classes : les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques. Plus précisément, BCL-2 est une protéine anti-apoptotique qui est exprimée dans le cytoplasme des cellules basales de l'épithélium dans les tissus prostatiques normaux et à un stade hyperplasique (Yoshino *et al.*, 2006). La surexpression de BCL-2 a été liée à la survie des cellules cancéreuses de la prostate dans un environnement dépourvu d'androgènes et donc à la résistance à la thérapie androgénique (Yoshino *et al.*, 2006). Une autre étude a mis en évidence que l'inhibition de l'expression de BCL-2 permet de retarder la progression des cellules cancéreuses (Miayake *et al.*, 2000). En revanche, l'expression de cette protéine chez des patients avec un cancer de la prostate résistant à la castration corrèle avec un bon pronostic lorsque les patients sont traités par une chimiothérapie à base de taxanes (Yoshino *et al.*, 2006) (Fuzio *et al.*, 2011). Le rôle fonctionnel de BAK et BAX, qui sont des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2, est d'inhiber la protection contre l'apoptose. La présence de mutations sur les gènes BAK et BAX est corrélée avec le développement et la progression des cellules cancéreuses (Yoshino *et al.*, 2006). Deux autres protéines pro-apoptotiques de cette famille ont été investiguées pour leurs implications dans le cancer de la prostate : NOXA et PUMA (Diallo *et al.*, 2007). Ces deux protéines font l'objet d'une investigation plus approfondie dans le cadre de ce projet de recherche de doctorat (voir partie 1.4.2.1.1).

Les recherches liées aux biomarqueurs, seuls ou en combinaison, sont de plus en plus nombreuses et semblent pour la plupart très prometteuses. Néanmoins, plusieurs biais sont connus et limitent leur validation pour une utilisation en clinique. Ces biais découlent des différences dans la constitution des cohortes de patients, notamment en ce qui concerne leurs caractéristiques clinico-pathologiques, dans les méthodologies de prélèvements utilisées, dans les méthodologies de conservation des échantillons, et dans les traitements déjà subis par les patients. De plus, le cancer de la prostate étant très souvent asymptomatique et très hétérogène, la découverte de biomarqueurs génériques est un défi avec des enjeux scientifiques lourds. L'émergence de nouvelles voies de recherche, telles que l'utilisation de

technologies à haut débit, l'analyse protéomique et génomique (Prolaris, OncotypeDx et Decipher) vont faciliter la découverte de nouveaux biomarqueurs. Néanmoins, ces tests présentent actuellement un coût importants, les rendant restreints ou non utilisable en clinique. Les approches multiplexes visent à identifier rapidement des meilleures combinaisons de biomarqueurs et optimiser au mieux la détection et la caractérisation du cancer de la prostate. De plus, un grand nombre de nouvelles recherches et d'essais cliniques sont mis en place pour améliorer le diagnostic et la prédiction du pronostic des patients (développement de tests génomiques) et pour offrir aux patients des nouveaux traitements (immunothérapie, combinaison de traitements).

1.4.2 Présentation des biomarqueurs d'intérêt de ce projet de recherche

En l'état actuel du dépistage du cancer de la prostate et du suivi des patients atteints de cette maladie, il est nécessaire de caractériser de nouveaux biomarqueurs qui permettent de déterminer avec plus de précision et de fiabilité le diagnostic et la progression du cancer de la prostate. Le choix de l'étude de la combinaison de PUMA-NOXA, membres de la famille des protéines BCL-2, et de la combinaison des membres de la famille ERBB comme biomarqueurs pour ce projet de recherche a été fait en s'inspirant de la littérature et des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire.

1.4.2.1 Famille des protéines BCL-2

Les membres de la famille des protéines BCL-2 régulent la mort cellulaire en réponse à des signaux de contraintes intracellulaires (comme l'hypoxie, les facteurs de croissance, la privation de cytokines, les dommages à l'ADN ou certains médicaments) (Warren *et al.*, 2019). La mort cellulaire peut se traduire par deux mécanismes : la nécrose ou l'apoptose (Nikoletopoulou *et al.*, 2013). La nécrose est une mort prématurée et non programmée d'une cellule, tandis que l'apoptose est un processus que les cellules déclenchent pour leur autodestruction. Elle contribue au développement et à l'homéostasie des tissus normaux, et elle est un obstacle majeur pour le développement du cancer (Correia *et al.*, 2015). Plus spécifiquement, l'apoptose peut être soit une apoptose intrinsèque (ou voie mitochondriale, donc induite par des signaux internes à la cellule) ou une apoptose extrinsèque (déclenchée par un signal extérieur à la cellule) (Elmore, 2007). Cette famille de protéines contient trois groupes structurellement et fonctionnellement distincts caractérisés par des motifs structuraux appelés domaines BH (domaines d'homologie avec BCL-2) (Figure 11) (Shamas-Din *et al.*, 2013) (Warren *et al.*, 2019).

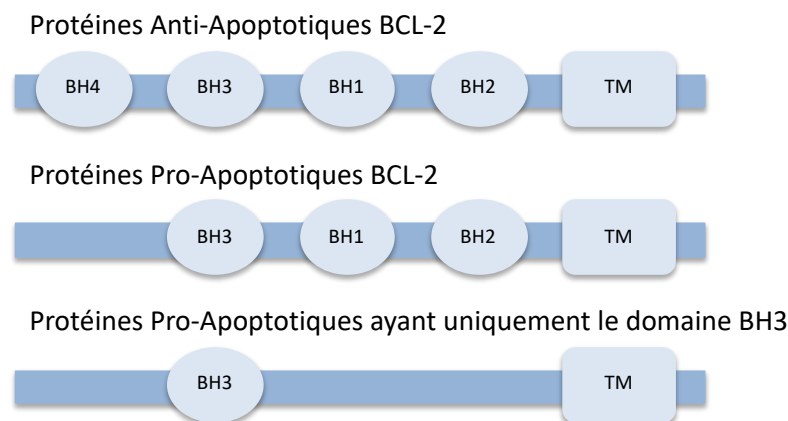


Figure 11: Structure des protéines membres de la famille des BCL-2 (B-cell lymphoma 2).

BH3 = Domaine d'homologie 3 des BCL-2, TM = Domaine Transmembranaire. Adapté de (L. N. Zhang *et al.*, 2013).

Les membres anti-apoptotiques partagent quatre de ces domaines d'homologie (BH1-4), alors que les membres pro-apoptotiques possèdent soit trois domaines BH (BH1-3), soit uniquement le domaine BH3 (Levine *et al.*, 2008) (Tableau 3) (Shamas-Din *et al.*, 2013). Les protéines qui ont les trois domaines BH1-3 sont considérées comme pro-apoptotiques effectrices tandis que celles ayant uniquement le domaine BH3 sont les protéines BCL-2 pro-apoptotiques initiateuses (Levine *et al.*, 2008) (D. C. Huang *et al.*, 2000).

Tableau 3: Liste des structures, fonctions et membres de la famille des BCL-2.

Structure	Fonction	Membres
Quatre domaines BH (BH1-4)	Anti-apoptotique	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1 et MCL-1
Trois domaines BH (BH1-3)	Pro-apoptotique effectrice	BAX, BAK
Uniquement le domaine BH3	Pro-apoptotique initiateuse	BIK, BID, BAD, NOXA, BMF, PUMA, BIM et HRK

Lorsque les cellules reçoivent des signaux de mort intrinsèque, il y a activation de la transcription des membres pro-apoptotiques ayant uniquement le domaine BH3 (L. N. Zhang *et al.*, 2013). Ces protéines se lient aux membres anti-apoptotiques afin d'en inhiber leur activité. Cette inhibition va entraîner l'activation des effecteurs BAK et BAX. Une fois activés, ils forment un oligomère afin de créer des pores dans la membrane externe mitochondriale conduisant à sa perméabilisation, à la libération dans le cytosol du cytochrome c de l'espace intermembranaire et à l'initiation en cascade de l'activation des caspases conduisant à l'apoptose (Kuwana *et al.*, 2005) (Certo *et al.*, 2006) (D. H. Lee *et al.*, 2008) (Kang *et al.*, 2009).

Les protéines pro-apoptotiques ayant uniquement le domaine BH3 sont souvent divisées en deux sous-groupes en fonction de leur capacité à interagir avec les protéines anti-apoptotiques. Le premier sous-groupe correspond aux initiateurs directs tels que BID et BIM qui vont directement se lier aux effecteurs BAK et BAX, et donc les activer (Letai *et al.*, 2002) (Kuwana *et al.*, 2005). À noter que la suppression combinée de l'expression de BID et BIM n'entraîne qu'une légère apoptose intrinsèque, ce qui suggère que l'activation de BAX et BAK nécessite la présence d'initiateurs de l'apoptose supplémentaires ou alternatifs (Willis *et al.*, 2007). Le deuxième sous-groupe de protéines pro-apoptotiques ayant uniquement le domaine BH3 correspond aux sensibilisateurs qui vont inhiber le réseau des protéines anti-apoptotiques afin d'agir indirectement sur BAX et BAK (Letai *et al.*, 2002) (Shibue *et al.*, 2006). Ce sous-groupe contient BAD, BMF, HRK, NOXA et PUMA. L'interaction entre ces protéines sensibilisatrices et les protéines anti-apoptotiques est sélective (Figure 12). Par exemple, PUMA est capable de se lier et d'inhiber toutes les protéines anti-apoptotiques (Nakano *et al.*, 2001) (Yu *et al.*, 2008) tandis que NOXA peut se lier uniquement à certaines d'entre elles telles que MCL1 et A1 (Oda *et al.*, 2000) (Ploner *et al.*, 2008). Il est à noter que l'équilibre entre les protéines pro et anti-apoptotiques détermine le sort de la cellule.

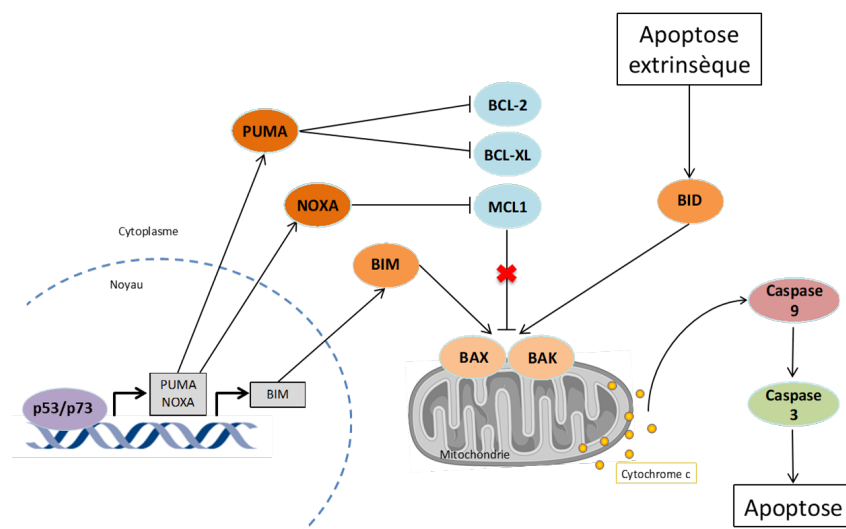


Figure 12: Voie de signalisation mitochondriale de l'apoptose ciblée sur les protéines PUMA et NOXA.
Adaptée de (Strasser, 2005)

1.4.2.1.1 Rôle de PUMA et NOXA dans la cellule

Ces deux protéines sont impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose.

PUMA est une des protéines pro-apoptotiques, ayant uniquement le domaine BH3, impliquée dans l'initiation de l'apoptose (L. N. Zhang *et al.*, 2013). Parmi tous les régulateurs transcriptionnels du gène *PUMA*, le plus important est p53. Une fois activé, la transcription de *PUMA* va permettre la production de quatre isoformes différentes (α , β , γ et δ). Ces isoformes sont des formes tronquées de la protéine PUMA. Seules les isoformes α et β ont un rôle fonctionnel connu pour avoir des propriétés apoptotiques car ce sont les seules à contenir le domaine BH3 qui est l'élément essentiel pour l'interaction avec les protéines anti-apoptotiques (Nakano *et al.*, 2001). Cependant une étude montre un équilibre fonctionnel entre ces deux isoformes (Tampio *et al.*, 2009). PUMA est un médiateur essentiel de la voie apoptotique dépendante de p53. Cependant, il semble que PUMA puisse aussi être activée de façon indépendante de p53 par l'intermédiaire de p73, un homologue de p53 (Jeffers *et al.*, 2003). D'un autre côté, PUMA peut être régulée négativement au niveau transcriptionnel, par l'activation du répresseur Slug qui va inhiber la transcription de *PUMA* (W. S. Wu *et al.*, 2005). Durant la dernière décennie, la modulation de l'expression de PUMA pourrait être une stratégie thérapeutique dans le cas de maladies réfractaires aux hormones telles que le cancer du sein (Roberts *et al.*, 2011). Récemment, la littérature rapporte que l'inhibition de Slug est efficace pour conduire à l'expression de PUMA et donc augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose dans un contexte de maladie du sein métastatique (Q. Sun *et al.*, 2018).

NOXA est une autre protéine pro-apoptotique, ayant uniquement le domaine BH3, importante dans l'initiation de l'apoptose (L. N. Zhang *et al.*, 2013). La transcription du gène *NOXA* est induite par p53 suite à des dommages à l'ADN et lors de l'apoptose induite par hypoxie (Oda *et al.*, 2000) (Villunger *et al.*, 2003). Comme pour PUMA, des travaux ont montré que la transcription de *NOXA* est indépendante de p53 via les protéines p73 ou E2F1 (Hershko *et al.*, 2004) (Flinterman *et al.*, 2005). Il est à noter que NOXA est moins efficace que PUMA pour le contrôle de l'apoptose médiée par p53 puisque sa fonction d'inhibiteur des protéines anti-apoptotiques se limite à MCL1 et A1 seulement (Ploner *et al.*, 2008). Le chevauchement fonctionnel, même partiel, de PUMA et NOXA indique que, dans une certaine mesure, ils sont à même de coopérer à la bonne initiation de l'apoptose. Par exemple, lorsque la fonction de PUMA va être compromise, le niveau d'expression de NOXA va être augmenté (Michalak *et al.*, 2009). De plus, dans le cas d'une leucémie lymphocytaire chronique (L. N. Zhang *et al.*, 2013) et du cancer du sein (S. Suzuki *et al.*, 2009), NOXA a été identifiée comme pouvant être une bonne cible thérapeutique potentielle en raison de sa liaison spécifique avec MCL1.

1.4.2.1.2 Expression de PUMA et NOXA dans les cancers

Le lien entre l'expression de PUMA et la progression du cancer semble controversé dans la littérature. Un grand nombre d'études ont en effet montré qu'une faible expression de PUMA est associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints d'un mélanome (Karst *et al.*, 2005), d'un cancer du côlon (Sinicrope *et al.*, 2008), d'un carcinome hépatocellulaire lié au virus de l'hépatite B (Peng *et al.*, 2015) ou d'un carcinome colorectal (H. Xiong *et al.*, 2017). L'évaluation du niveau d'expression de PUMA présente aussi de l'intérêt, en combinaison avec celle de BIM, pour renforcer la stratification des patients avec un cancer du côlon (Sinicrope *et al.*, 2008). Cependant, il a été montré que la forte expression de PUMA est associée significativement à la progression d'un adénocarcinome de la vésicule biliaire (Cai *et al.*, 2013). D'autre part, l'expression de PUMA seule n'est pas associée à la survie des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire mais présente un potentiel pronostique lorsqu'elle est combinée avec une forte expression de p53 chez ces mêmes patientes (Skirnisdottir *et al.*, 2012).

Beaucoup moins d'études ont été conduites sur NOXA mais elles sont tout aussi controversées que celles sur PUMA. Les variations de niveau d'expression de NOXA semblent en effet présenter un grand intérêt pour le suivi de la progression du cancer colorectal (Jansson *et al.*, 2003) (Kosmidou *et al.*, 2020) alors que dans une autre étude dans le même cancer, aucune association n'a pu être mise en évidence entre l'expression de NOXA et la progression cancéreuse (Sinicrope *et al.*, 2008).

Une seule publication a décrit l'étude spécifique des protéines PUMA et NOXA, seules et en combinaison, dans le cancer de la prostate (Diallo *et al.*, 2007). Cette étude effectuée dans notre laboratoire regroupe 64 patients atteints d'un cancer de la prostate qui ont eu une prostatectomie radicale. Dans cette étude, l'expression de ces deux protéines est supérieure dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux. La forte expression de NOXA seule est associée significativement avec une augmentation du risque de rechute biochimique alors que les niveaux d'expression de PUMA ne le sont pas (Diallo *et al.*, 2007). Cette étude a également montré que la combinaison d'une faible expression de PUMA et d'une faible expression de NOXA est associée à un plus important risque de rechute biochimique précoce (Diallo *et al.*, 2007).

1.4.2.2 Famille ERBB : EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4

Les membres de la famille ERBB font parties de la super famille des facteurs de croissance épidermiques qui a été découverte dans les années 1950 (Cohen *et al.*, 1957). Il s'agit d'une sous-classe

regroupant quatre récepteurs membranaires ubiquitaires qui présentent un domaine tyrosine kinase (Gschwind *et al.*, 2004) : EGFR (récepteur de facteur de croissance épidermique, nommé aussi HER1 ou ERBB1) découvert en 1978 (Carpenter *et al.*, 1978) et cloné en 1984 (Ullrich *et al.*, 1984), ERBB2 (nommé aussi HER2) caractérisé en 1985 (Coussens *et al.*, 1985), ERBB3 (nommé aussi HER3) cloné en 1989 (Plowman *et al.*, 1990) et ERBB4 (nommé aussi HER4) cloné en 1992 (Plowman *et al.*, 1993). L'abréviation ERBB est dérivée du nom de l'oncogène *v-erb-B* du virus de l'érythroblastose aviaire, auquel ces récepteurs sont homologues, alors que l'abréviation HER signifie « récepteur de facteur de croissance épidermique humain ». Les protéines de cette famille exercent un rôle important dans les voies de signalisation de divers processus cellulaires tels que la migration, la prolifération, le métabolisme, la différenciation et la survie (Gschwind *et al.*, 2004) (Holbro *et al.*, 2003) (Hynes *et al.*, 2009) (Schlessinger, 2014). En raison de leurs rôles dans ces processus, les récepteurs ERBB peuvent devenir des oncoprotéines majeures lorsque leurs gènes sont mutés.

1.4.2.2.1 Rôle de EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4 dans la cellule

Les quatre récepteurs de cette famille ERBB ont de 40 à 50 % d'homologie entre eux et sont constitués de trois domaines fonctionnels : un domaine extracellulaire assurant la liaison avec le ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire avec une activité tyrosine kinase (Lièvre *et al.*, 2010). Le domaine intracellulaire, qui a le plus haut degré d'homologie, regroupe un site de liaison de l'ATP, le site catalytique de l'enzyme et une extrémité riche en tyrosine pouvant être phosphorylée (Ruppert *et al.*, 2011). Le domaine transmembranaire va permettre aux récepteurs de s'ancrer dans la membrane plasmique. Le domaine extracellulaire, qui présente le moins d'homologie entre les quatre protéines, assure la spécificité de chaque récepteur avec ses ligands via le site de liaison (Normanno *et al.*, 2003) (Holbro *et al.*, 2003) (Figure 13).

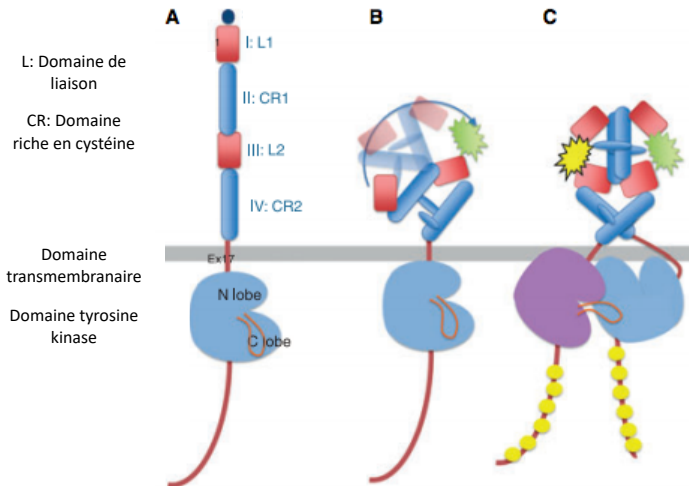


Figure 13: Structure de l'activation et de la dimérisation des membres de la famille des ERBBs.

Structure des membres de la famille des ERBBs (A), activation (B) et dimérisation par la liaison du ligand (C). Provenant de (Mitsudomi *et al.*, 2010).

Chaque récepteur est inactif quand il est sous forme de monomère. Lorsqu'un ligand vient se fixer au domaine extracellulaire, un changement de conformation de la protéine ERBB permet le rapprochement de deux monomères (Figure 13) (Ruppert *et al.*, 2011) qui constituent alors un complexe d'homodimère ou d'hétérodimère, la forme activée du récepteur ERBB (Holbro *et al.*, 2003). Le rapprochement des deux domaines intracellulaires induit la phosphorylation des résidus tyrosine kinase et la transduction du signal de la surface cellulaire vers le noyau via différentes protéines adaptatrices intracellulaires telles que les protéines à domaines SH2/SH3, les protéines G monomériques et les protéines kinases (Ruppert *et al.*, 2011).

Il est à noter que chaque récepteur ERBB présente des affinités spécifiques avec ses différents ligands (Figure 14) sauf pour ERBB2 qui n'a pas de ligands connus. Par ailleurs, ERBB3 ne présente pas d'activité tyrosine kinase (Holbro *et al.*, 2003) (Ruppert *et al.*, 2011). Malgré leur particularité, ces deux récepteurs sont en mesure de former des hétérodimères de deux façons (Roskoski, 2014). La première implique un seul ligand qui va interagir avec le récepteur afin de former efficacement le complexe dimérique fonctionnel entre les deux récepteurs (Lemmon *et al.*, 2010). La seconde implique deux ligands qui vont chacun contribuer à la formation du complexe dimérique entre les deux récepteurs (Roskoski, 2014). De ce fait, ces récepteurs ERBB vont pouvoir suivre un processus d'activation comme les autres membres de cette famille. Il existe un certain nombre de ligands plus ou moins spécifiques avec les récepteurs, chacun contient un domaine de type EGF (Epidermal Growth Factor) qui confère une spécificité de liaison. Ces ligands peuvent être divisés en trois groupes. Le premier inclut EGF, le TNF- α

(transforming growth factor- α) et le AR (amphiregulin) qui se lient spécifiquement à EGFR. Le second groupe est constitué de BTC (betacellulin), HB-EGF (heparin-binding EGF) et EPR (epiregulin) qui présentent une double spécificité en se liant à EGFR et ERBB4. Le troisième et dernier groupe est composé des NRG (neuregulins) qui forme deux sous-groupes en fonction de leur capacité à se lier à ERBB3 et ERBB4 (NRG-1 et NRG-2) ou uniquement à ERBB4 (NRG-3 et NRG-4) (Figure 14) (Holbro *et al.*, 2003).

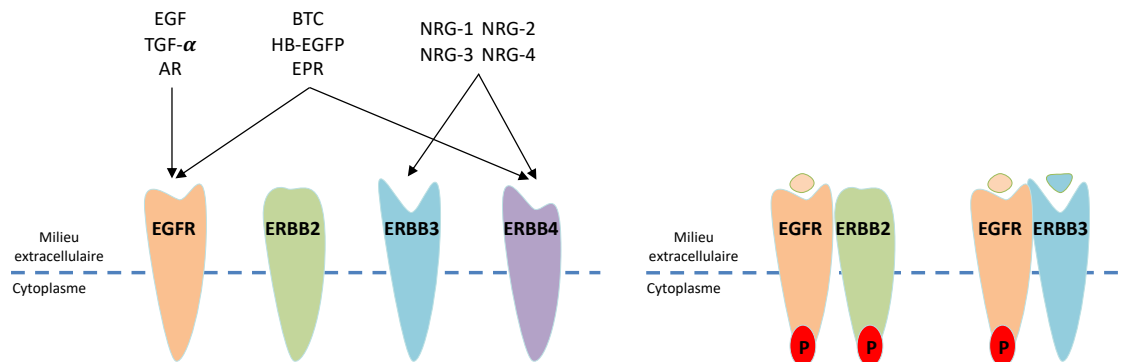


Figure 14: Schéma des affinités spécifiques entre les membres ERBBs et les ligands.
Adaptée de (Holbro *et al.*, 2003)

En fonction du ligand fixé et des récepteurs formant les homo ou hétéro-dimères, différentes voies de signalisation sont activées telles que la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, les voies RAS/RAF/MEK/MAPK et phospholipase C (PLC γ) ou encore les voies STAT (Fang *et al.*, 2014). Toutes ces voies de signalisation sont connues pour intervenir dans la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse, le potentiel invasif des cellules cancéreuses et le développement des métastases (Figure 15) (Roskoski, 2014) (Yarden *et al.*, 2012).

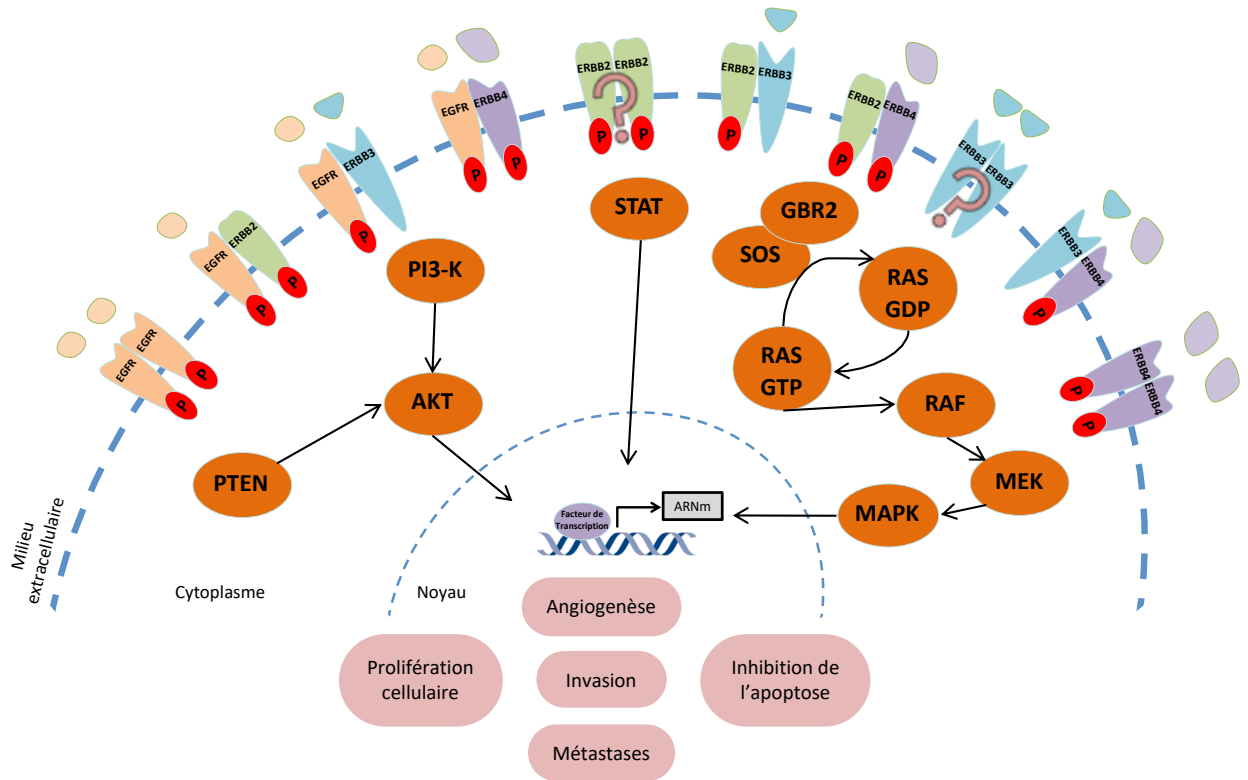


Figure 15: Schéma des potentiels homo et hétéro dimères et des voies de signalisation activées par les membres de la famille ERBBs.

Adaptée de (Holbro *et al.*, 2003) et (Fang *et al.*, 2014).

1.4.2.2.2 Expression des membres de la famille ERBB dans les cancers

Plusieurs recherches ont mis en évidence l'implication des membres de la famille ERBB dans le développement et la progression de nombreux cancers chez l'humain (Gschwind *et al.*, 2004) (Holbro *et al.*, 2003). Ces récepteurs ont largement été étudiés aussi bien pour leur potentiel de biomarqueurs oncogéniques que pour leur exploitation comme cibles thérapeutiques (Gschwind *et al.*, 2004) (Appert-Collin *et al.*, 2015).

Un grand nombre d'article montre le potentiel d'**EGFR** comme biomarqueur prédictif. Ainsi, la forte expression de EGFR dans les cellules cancéreuses est significativement associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de carcinome épidermoïde de la tête et du cou (Beck *et al.*, 2016) (Vigneswara *et al.*, 2018), de cancer ovarien (Puvanenthiran *et al.*, 2018), de cancer colorectal (Yiu *et al.*, 2016), de glioblastome (Shinojima *et al.*, 2003), de cancer de l'oropharynx (Taberna *et al.*, 2018), de cancer du poumon (Duffy *et al.*, 2018), d'adénocarcinome canalaire pancréatique (Fujita *et al.*, 2011) et de cancer

du sein, qu'il soit triple négatif (L. Zhang *et al.*, 2015) ou un des divers sous-types de ce cancer (Abd El-Rehim *et al.*, 2004) (van Reesema *et al.*, 2016).

La surexpression de **ERBB2** a été identifiée comme un marqueur de diagnostic et un indicateur de mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer du sein (Slamon *et al.*, 1987) (Menard *et al.*, 2001) (Abd El-Rehim *et al.*, 2004) (Barnes *et al.*, 2005) (Anderson *et al.*, 2014). Cette capacité de biomarqueur est aussi observée pour le cancer gastrique (Gu *et al.*, 2015) (Maeda *et al.*, 2019), le cancer de l'ovaire (Berchuck *et al.*, 1990), le cancer endométrial (Morrison *et al.*, 2006) et le cancer du poumon (L. Liu *et al.*, 2010). Cependant, d'autres travaux ont montré qu'une faible expression de ERBB2 est associée au développement de gliomes (Mineo *et al.*, 2007) ou d'adénocarcinomes pulmonaires métastatiques (Reis *et al.*, 2015). Alors que d'autres travaux n'ont pas montré la moindre association avec le mauvais pronostic et le développement du cancer gastrique (Tateishi *et al.*, 1992) ou alors seulement une tendance non significative avec un mauvais pronostic des patients atteints par un carcinome épidermoïde de la tête et du cou (Beck *et al.*, 2016). Bien que la littérature présente une majorité d'étude favorable au fait qu'une forte expression de ERBB2 soit associée au mauvais pronostic des patients, il reste que ce rôle de ERBB2 dans la progression du cancer semble dépendant du type de cancer considéré et du stade de la maladie.

La faible expression de **ERBB3** est associée à un mauvais pronostic dans le cancer colorectal (Baiocchi *et al.*, 2009). À l'opposé, la forte expression de ERBB3 est significativement associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints du cancer épidermoïde de la tête et du cou (Kim *et al.*, 2020), ou du cancer du sein (Witton *et al.*, 2003) (Sassen *et al.*, 2008). Les résultats sont assez controversés pour l'utilisation de ERBB3 seule alors que l'utilisation de ERBB3 en combinaison avec celle d'autres membres de la famille ERBB montrent des résultats qui vont dans la même direction. Ainsi, la combinaison d'une haute expression de ERBB3 combinée à une haute expression de ERBB2 est associée significativement avec un mauvais pronostic pour les patientes avec un cancer du sein (Abd El-Rehim *et al.*, 2004) (Barnes *et al.*, 2005). Dans le cancer de l'ovaire, la combinaison de la haute expression de EGFR et de ERBB3 est associée à un mauvais pronostic (Puvanenthiran *et al.*, 2018). Deux autres travaux mettent en évidence que la combinaison de la haute expression de EGFR, de ERBB2 et de ERBB3 est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Witton *et al.*, 2003) et de l'ovaire (Puvanenthiran *et al.*, 2018).

La forte expression de **ERBB4** est associée significativement avec un mauvais pronostic pour les patients ayant un cancer colorectal (Baiocchi *et al.*, 2009) (Jia *et al.*, 2020) ou un cancer gastrique (Xu *et al.*, 2018). Dans le cancer du sein (Witton *et al.*, 2003) (Barnes *et al.*, 2005) (J. Wang *et al.*, 2016), de l'ovaire

(Puvanenthiran *et al.*, 2018), de la vessie (Kassouf *et al.*, 2008) et du pancréas (Thybusch-Bernhardt *et al.*, 2001), c'est la faible expression de ERBB4 qui semble associée de façon significative avec la survie des patients. Mais d'autres travaux ne montrent aucun lien significatif entre l'expression de ERBB4 et la survie des patients dans le cancer du sein (Kew *et al.*, 2000) (Abd El-Rehim *et al.*, 2004) ou du pancréas (Graber *et al.*, 1999). Malgré ces résultats controversés, plusieurs articles donnent de l'importance au niveau d'expression de ERBB4 en tant que biomarqueur lorsqu'il est combiné avec celui des autres membres de la famille ERBB. En effet, la combinaison d'une haute expression de ERBB3 et de ERBB4 est associée à un mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer du sein (Abd El-Rehim *et al.*, 2004). De plus, une faible expression de ERBB4 couplée à une forte expression de ERBB2 est associée à un mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer du sein (Barnes *et al.*, 2005). Dans le cas du cancer de la vessie, c'est la combinaison de la haute expression de EGFR et la faible expression de ERBB4 qui est associée à un mauvais pronostic pour les patients (Kassouf *et al.*, 2008). Une étude montre même que la combinaison de la haute expression de EGFR, de ERBB2 et de ERBB4 permet une meilleure stratification des patientes atteintes d'un cancer du sein (Abd El-Rehim *et al.*, 2004).

1.4.2.2.3 Approches thérapeutiques ciblant les membres de la famille ERBB

Les domaines internes et externes des récepteurs tyrosines kinases de la famille ERBB sont des cibles prometteuses pour des thérapies (Rowinsky, 2004) telles que des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs de tyrosine kinase à petites molécules (Mendelsohn *et al.*, 2000) (de Bono *et al.*, 2002) (Shawver *et al.*, 2002) (Wood, 2002). Les anticorps agissent à l'extérieur de la cellule en rentrant en compétition avec le ligand du récepteur (Hubert, 2006). Les inhibiteurs vont pénétrer dans la cellule afin d'inhiber directement l'activité tyrosine kinase par compétition avec l'ATP. Ce second type de traitement présente des limites en terme de toxicité car la majorité de ces inhibiteurs sont multi-cibles (Hubert, 2006). Ces thérapies peuvent donc cibler soit spécifiquement un seul membre soit plusieurs membres de cette famille (Figure 16).

Le Cétuximab (Erbix) est un anticorps monoclonal chimérique qui inhibe de manière compétitive la liaison du ligand EGF avec le récepteur EGFR (Arteaga *et al.*, 2014). Cette thérapie est approuvée pour une utilisation en monothérapie (Lo Nigro *et al.*, 2016) ou associée avec une chimiothérapie dans le cadre du cancer colorectal métastatique (Snyder *et al.*, 2005). Le Cétuximab est aussi approuvé pour une utilisation en combinaison avec la radiothérapie pour les patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou (Vigneswara *et al.*, 2018). Les anticorps Matuzumab (EMD72000) et le Panitumumab

(ABX-EGF), qui se lie à EGFR avec une affinité élevée, bloquent de manière compétitive la liaison du ligand. Ils ont montré un grand intérêt dans le contexte du traitement du cancer du poumon (Socinski, 2007). L'essai de phase II de l'étude de Matuzumab en combinaison avec la chimiothérapie couramment utilisée pour un traitement de deuxième intention dans ce cancer n'a pas montré d'amélioration significative par rapport à l'utilisation de la chimiothérapie seule (Schiller *et al.*, 2010). En ce qui concerne l'utilisation du Panitumumab, celui-ci n'a pas été concluant lors d'utilisation en combinaison avec les traitements standards (Schuette *et al.*, 2015; Spigel *et al.*, 2017). De plus, il est non recommandé pour une utilisation clinique chez les patients atteints d'un adénocarcinome de type KRAS non muté (Schuette *et al.*, 2015). Le Gefitinib (Iressa) et l'Erlotinib (Tarceva) sont des inhibiteurs de première génération de la tyrosine kinase de EGFR (Ruiz-Camps *et al.*, 2020). Le Gefitinib va se lier au site de liaison de l'ATP de EGFR tandis que l'Erlotinib va inhiber la phosphorylation intracellulaire de la tyrosine kinase associée à EGFR (Carey *et al.*, 2006) (Yun *et al.*, 2007). Ils sont tous les deux approuvés pour le traitement du cancer du poumon (C. Zhou *et al.*, 2011) (Duffy *et al.*, 2018).

Le Trastuzumab (Herceptin) est un anticorps monoclonal humanisé recombinant qui se lie spécifiquement à l'épitope du domaine extracellulaire de ERBB2 (Clynes *et al.*, 2000). C'est un traitement approuvé dans le cas du cancer du sein en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie pour des formes plus avancées (Jaques *et al.*, 2020). Il a aussi montré son efficacité pour le traitement du cancer gastrique (Maeda *et al.*, 2019) et du cancer endométrial (Santin *et al.*, 2008). Du fait de l'absence de ligand connu pour ERBB2, cette protéine semble être le partenaire de dimérisation préféré des autres membres de la famille ERBB (Tzahar *et al.*, 1996) (Graus-Porta *et al.*, 1997). Par conséquent, des thérapies multicibles ont été développées telles que le Pertuzumab (Omnitarg), un anticorps qui reconnaît le domaine extracellulaire d'hétérodimérisation entre ERBB2 et ERBB3 (Agus *et al.*, 2002) ou le Lapatinib (Tyverb), un inhibiteur qui va se lier au domaine de phosphorylation intracellulaire de EGFR et ERBB2 pour empêcher l'autophosphorylation du récepteur lors de la liaison du ligand (Konecny *et al.*, 2006). Ces traitements peuvent être respectivement utilisés en combinaison avec le Trastuzumab pour un cancer du sein métastatique (Tevaarwerk *et al.*, 2009) (M. B. Smith *et al.*, 2012) ou en combinaison avec une chimiothérapie pour un cancer du sein avancé (Johnston *et al.*, 2006) (Tevaarwerk *et al.*, 2009) (X. Zhou *et al.*, 2009). L'Afatinib (Gilotrif) et le Dacomitinib (Vizimpro) sont des inhibiteurs de la tyrosine kinase de seconde génération (Ruiz-Camps *et al.*, 2020). Il s'agit de bloqueurs irréversibles qui se lient de manière covalente aux résidus de la cystéine du domaine catalytique des membres de la famille ERBB (Solca *et al.*, 2012) (Brzezniak *et al.*, 2013) (Arteaga *et al.*, 2014). Ils ont été approuvés pour une utilisation dans le cadre du cancer du poumon non à petites cellules métastatiques (Reungwetwattana *et al.*, 2013) (Wind *et al.*,

2017). Le Nératinib (Nerlynx) se lie et inhibe EGFR, ERBB2 et ERBB4 en empêchant l'autophosphorylation des résidus tyrosine des récepteurs (Deeks, 2017). Il est approuvé pour le traitement du cancer du sein à la suite d'une thérapie adjuvante à base de Trastuzumab (Chan *et al.*, 2016).

Le potentiel de ERBB3 comme cible thérapeutique unique pour le traitement du cancer semble moins étudié que celui des autres membres de cette famille, en raison de l'absence d'activité kinase (Mishra *et al.*, 2018). Néanmoins comme vu précédemment, il peut être un partenaire d'hétéro-dimérisation crucial pour les autres membres de cette famille. Il y a, par exemple, le Pertuzumab (Omnitarg) pouvant cibler les complexes ERBB3 et ERBB2 (Agus *et al.*, 2002). Il existe également l'anticorps monoclonal Seribantumab (MM-121) qui empêche efficacement la liaison entre ERBB3 et son ligand afin de bloquer l'hétérodimérisation avec EGFR (Mishra *et al.*, 2018). Son utilisation se fait dans le cadre du traitement des cancers du poumon non à petites cellules qui sont positifs à l'Héréguline (Sequist *et al.*, 2019).

La littérature ne rapporte pas d'anticorps monoclonaux ou d'inhibiteurs spécifiques à ERBB4. Mais comme vu auparavant, ERBB4 est la cible de l'Afatinib, du Dacomitinib et du Nératinib en lien avec leurs actions multi-cibles (Segers *et al.*, 2020).

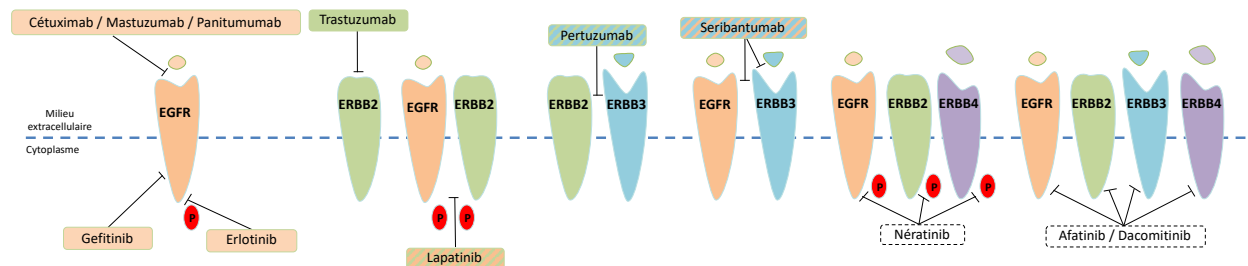


Figure 16: Résumé des approches thérapeutiques existantes pour les membres de la famille ERBBs.

1.4.2.2.4 Expression des membres de la famille ERBB et approches thérapeutiques les ciblant dans le cancer de la prostate

La modulation des expressions des membres de la famille ERBB se confirme majoritairement dans le cancer de la prostate, par rapport à ce qui est obtenu pour les autres cancers. En ce qui concerne EGFR, l'association d'une haute expression avec le mauvais pronostic des patients atteints d'un cancer de la prostate a été observée par plusieurs équipes de recherche (Di Lorenzo *et al.*, 2002) (Peraldo-Neia *et al.*, 2011), incluant notre laboratoire (Koumakpayi *et al.*, 2010). Cependant pour les trois autres membres de cette famille les résultats semblent plus controversés. Pour ERBB2, plusieurs articles ne montrent aucune

association (Tambo *et al.*, 2009) (Koumakpayi *et al.*, 2010) alors qu'une autre étude identifie qu'une faible expression de ERBB2 est associée avec la rechute biochimique (Edwards *et al.*, 2006). Plusieurs travaux montrent également qu'une forte expression de ERBB2 est associée avec la mort liée spécifiquement à ce cancer (Di Lorenzo *et al.*, 2002) (Bartlett *et al.*, 2005) (Edwards *et al.*, 2006). En ce qui concerne ERBB3, une investigation identifie qu'une forte expression est associée à un mauvais pronostic pour les patients (Koumakpayi *et al.*, 2010) alors qu'une autre observation met en évidence qu'une faible expression nucléaire de ERBB3 est prédictive de la rechute biochimique pour les patients atteints d'un cancer de la prostate (Koumakpayi *et al.*, 2007). Finalement, ERBB4 a été identifiée comme un marqueur de mauvais pronostic, dans plusieurs travaux, lorsqu'elle est faiblement exprimée (Hernes *et al.*, 2004) (Edwards *et al.*, 2006). Cependant, plusieurs études rapportent une expression de ERBB4 trop faible pour obtenir des résultats probants ou aucun lien avec le pronostic des patients atteints d'un cancer de la prostate (Robinson *et al.*, 1996) (Hashemi *et al.*, 2016).

Les thérapies ciblant ces récepteurs de tyrosines kinases sont particulièrement étudiées et font l'objet de plusieurs essais cliniques dans le cadre du cancer de la prostate. Des essais cliniques utilisant Erlotinib comme inhibiteur spécifique de EGFR n'ont montré aucun bénéfice clinique en monothérapie ou en association avec des traitements conventionnels (tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie) chez les patients avec un cancer de la prostate (Festuccia *et al.*, 2009). L'utilisation de Trastuzumab ciblant spécifiquement la partie extracellulaire de ERBB2 a été testée pour le traitement des patients ayant progressé en cancer de la prostate résistant à la castration. L'essai clinique de phase II correspondant a identifié une très faible amélioration de la survie de ces patients (Ziada *et al.*, 2004). Un autre essai clinique prospectif de phase II a montré que l'utilisation de Lapatinib (inhibiteur de EGFR et ERBB2) pour des patients avec un cancer de la prostate n'avait pas d'effet significatif sur la survie des patients (Whang *et al.*, 2013). Un autre essai clinique de Phase II qui porte également sur l'utilisation du Lapatinib pour le traitement du cancer de la prostate qui a récidivé (NCT00103194) a montré que les patients qui présentent une faible expression de EGFR ont un plus mauvais pronostic puisqu'ils ne répondent pas correctement au traitement. Cette étude confirme encore l'importance de faire un criblage initial des patients en fonction de l'expression tumorale de EGFR afin de mieux prévoir l'efficacité du traitement à Lapatinib (G. Liu *et al.*, 2013). Que ce soit pour ERBB3 et ERBB4, il n'y a aucun essai clinique spécifique actuellement, probablement en raison de l'absence de thérapies spécifiques ciblant ces protéines. Néanmoins, des expériences *in vivo* sur des lignées cellulaires prostatiques ont démontré que l'utilisation d'inhibiteur pour ERBB3 (Jathal *et al.*, 2011) ou ERBB4 (Vexler *et al.*, 2008) n'a pas d'effet en monothérapie. Une autre recherche a testé l'effet du Pertuzumab (NCT02480010) (anticorps monoclonal

de ERBB2 et ERBB3) chez des patients atteints d'un cancer de la prostate. Malheureusement, cette étude a été interrompue au moment de l'analyse intermédiaire car aucun participant n'avait montré de diminution de l'APS. Finalement, ces résultats suggèrent que chaque membre de la famille ERBB peut être une cible thérapeutique potentielle mais nécessite un bon criblage des patients ainsi qu'une utilisation en supplément avec un traitement conventionnel.

1.5 Projet de thèse : Études multiparamétriques de biomarqueurs par immunofluorescence pour mieux suivre la progression du cancer de la prostate

1.5.1 Problématique du projet de recherche

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la troisième cause de mortalité liée au cancer chez les hommes au Canada. Un quart des patients diagnostiqués développeront une forme plus agressive de ce cancer. Bien que nous possédions plusieurs indices cliniques (Score de Gleason, taux d'APS, stade), ceux-ci sont insuffisants pour distinguer les cas à faibles risques de progression et les cas de cancers meurtriers. De ce fait, les cliniciens ont besoins de nouveaux outils plus efficaces pour assurer des traitements adaptés aux patients. À ce jour, très peu de biomarqueur de prédiction n'est encore utilisé en clinique.

L'utilisation de biomarqueurs de prédiction a l'avantage d'évaluer avec plus de précision et de fiabilité le diagnostic et la progression du cancer de la prostate. Le choix de l'étude de ces biomarqueurs pour ce projet de recherche a été fait en s'inspirant de la littérature et des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire. La décision de faire du multi-marquage par immunofluorescence sur des micro-étalages tissulaires nécessite une très faible quantité de tissus et permet également d'obtenir une analyse d'image standardisée et rapide. De plus, l'utilisation du multi-marquage par immunofluorescence permet également d'inclure des mélanges d'anticorps spécifiques discriminant les zones bénignes des zones tumorales.

1.5.2 Hypothèses de travail

Dans cette optique, il est nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs pertinents pour la stratification du cancer de la prostate. Les recherches antérieures du laboratoire sur les biomarqueurs, nous ont amené à élaborer les hypothèses suivantes :

1 – La combinaison de PUMA et NOXA est importante pour mieux prédire le pronostic des patients atteints d'un cancer de la prostate (Chapitre 1).

2 – L'analyse multiparamétrique des membres de la famille ERBB est importante pour mieux stratifier le cancer de la prostate en fonction du risque de progression (Chapitre 2).

1.5.3 Objectifs de recherche

De ces deux hypothèses découlent des objectifs comparables qui peuvent être décrits comme suit:

1 – Validation des anticorps et mise au point des marquages par immunofluorescence pour PUMA, NOXA, EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4. Cet objectif est essentiel pour assurer l'exactitude de la caractérisation et de la spécificité des anticorps utilisés pour la détection de chaque biomarqueur d'intérêt. De plus, la mise au point des marquages par immunofluorescence permet de garantir la bonne qualité de notre détection et de définir les conditions expérimentales optimales.

2 – Caractérisation des niveaux d'expression de PUMA, NOXA, EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4 sur une cohorte de 285 patients atteints d'un cancer de la prostate. Cet objectif est réalisé à partir des images d'immunofluorescence obtenues et analysées de façon quantitative et semi-automatique avec le logiciel Visiomorph.

3 – Analyses statistiques des corrélations entre les niveaux d'expression des différents biomarqueurs, seul ou en combinaison, et le pronostic des patients. Cet objectif vise dans un premier temps à analyser chaque biomarqueur indépendant avec les données cliniques des patients. Ensuite, les résultats seront combinés avec les données cliniques des patients, PUMA et NOXA d'un côté et les quatre membres de la famille ERBB de l'autre. Cette analyse permettra de confirmer ou non l'utilité en clinique de ces biomarqueurs en complément des données cliniques actuelles.

2 RÉSULTATS

2.1 Chapitre 1 : PUMA and NOXA expression in tumor-associated benign prostatic epithelial cells are predictive of prostate cancer biochemical recurrence

2.1.1 Article #1 : Résumé en français

Titre en français : L'expression de PUMA et NOXA dans les cellules épithéliales prostatiques bénignes associées à la tumeur est prédictive de la rechute biochimique du cancer de la prostate.

Contexte : Étant donné que la gestion du traitement dans le cancer de la prostate est souvent en fonction du risque, il est nécessaire de trouver des biomarqueurs pronostiques cliniquement stratifiant pour les patients atteints du cancer de la prostate. Nous avons évalué l'expression de PUMA et NOXA dans les tumeurs bénignes et tumorales de la prostate en utilisant la technique d'immunofluorescence et déterminer leur signification pronostic avec le cancer de la prostate. **Méthodes :** Les niveaux d'expressions de PUMA et NOXA ont été quantifiés sur six micro-étalages tissulaires (TMA) générés à partir d'échantillons de prostatectomie radicale (285 patients). Les TMA ont été construits en utilisant deux carottes de tissus bénins et deux carottes de tissus tumoraux pour chaque patient. L'association entre l'expression des biomarqueurs et la rechute biochimique à 3 ans a été établie en utilisant le log-rank et les analyses de régression COX multivariées. **Résultats :** L'analyse de Kaplan-Meier a montré une association significative entre la rechute biochimique et le niveaux extrêmes (faible ou fort) d'expression de PUMA dans les cellules épithéliales bénignes (Log-rank = 8,831, $p = 0,003$). De plus, l'analyse a révélé une association significative entre l'expression élevée de NOXA chez les cellules épithéliales bénignes et la rechute biochimique (Log-rank = 14,854, $p < 0,001$). La combinaison de l'extrême expression de PUMA et la forte expression de NOXA dans les tissus bénins a identifié les patients présentant le plus haut risque de rechute biochimique (Log rank = 16,778, $p < 0,001$) et dans l'analyse de régression Cox multivariée (HR : 2,935 CI (1,645 – 5,236), $p < 0,001$). **Conclusions :** La combinaison de l'expression des protéines de PUMA et NOXA dans les cellules épithéliales bénignes chez les patients était prédictive de la rechute biochimique après prostatectomie radicale et cela de façon indépendante de l'APS au moment du diagnostic, du score de Gleason et du stade pathologique.

2.1.2 Article #1 : Version finale soumise à *Cancers*

Cancers. 2020;12(11), 3187; <https://doi.org/10.3390/cancers12113187> (Clairefond *et al.*, 2020).

PUMA and NOXA expression in tumor-associated benign prostatic epithelial cells are predictive of prostate cancer biochemical recurrence

Sylvie Clairefond ^{1,2}, Benjamin Péant ¹, Véronique Ouellet ¹, Véronique Barrès ¹, Zhe Tian ^{1,2}, Dominique Trudel ^{1,3}, Pierre I. Karakiewicz ^{1,4}, Anne-Marie Mes-Masson ^{1,2} and Fred Saad ^{1,4,*}

¹ Centre de Recherche du Centre Hospitalier de L'Université de Montréal (CRCHUM) et Institut du Cancer de Montréal (ICM), Montreal, QC H2X 0A9, Canada; sylvie.clairefond@umontreal.ca (S.C.); benjamin.peant.chum@ssss.gouv.qc.ca (B.P.); veronique.ouellet.chum@ssss.gouv.qc.ca (V.O.); veronique.barres.chum@ssss.gouv.qc.ca (V.B.); zhe.tian@mail.mcgill.ca (Z.T.); dominique.trudel.chum@ssss.gouv.qc.ca (D.T.); pierre.karakiewicz@umontreal.ca (P.I.K.); anne-marie.mes-masson@umontreal.ca (A.-M.M.-M.)

² Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

³ Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

⁴ Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

* Correspondence: fred.saad@umontreal.ca; Tel.: +1-514-890-8000 (ext. 27466)

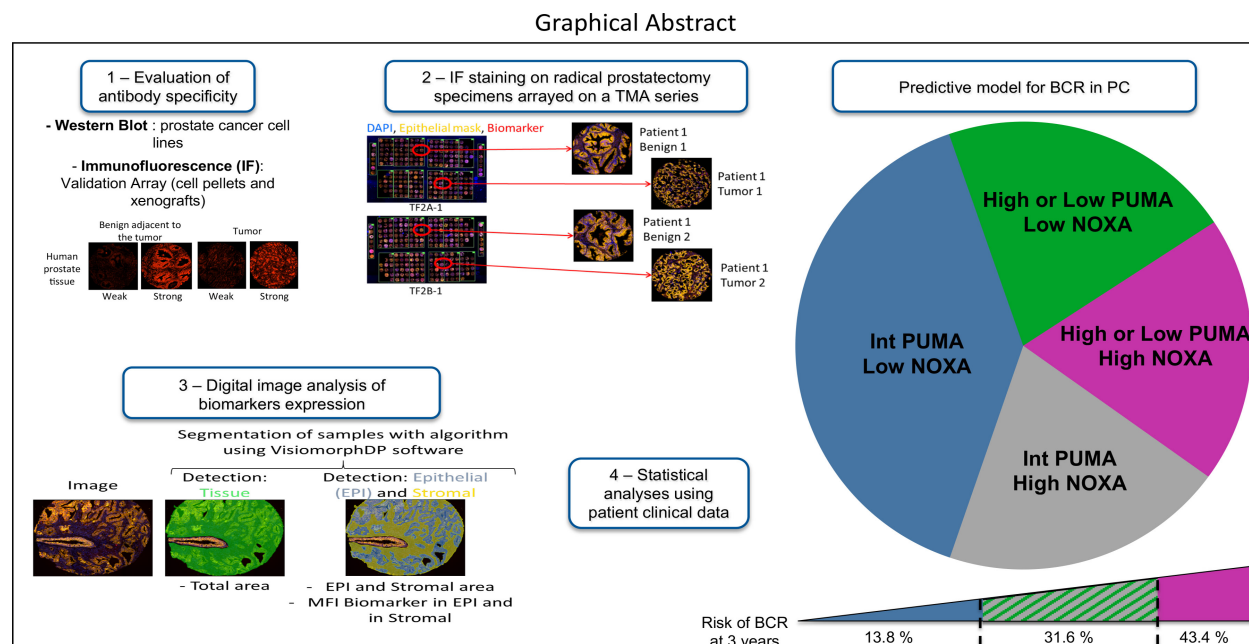
Received: 21 September 2020; Accepted: 27 October 2020; Published: 29 October 2020

2.1.2.1 Simple Summary

After receiving a diagnosis of prostate cancer, patients follow a routine treatment plan based on tumor grade, stage and prostate-specific antigen (PSA) level. However, studies in other cancers have shown the importance of using biomarkers to personalize treatments. With no approved biomarkers presently in use in prostate cancer, there is a clinical need to develop such stratification tools. Here our study shows that PUMA and NOXA are markers that have a high prognostic value when looking at their

presence in both benign and tumor glands within the prostate. Hence, the presence of these markers may help to better predict outcomes at diagnosis. Incorporating these markers into clinical practice may eventually lead to selective treatment options in newly diagnosed patients. This in turn should lead to better cancer control, potentially lowering the morbidity and mortality due to prostate cancer.

2.1.2.2 Graphical Abstract



2.1.2.3 Abstract

Background: Given that treatment decisions in prostate cancer (PC) are often based on risk, there remains a need to find clinically relevant prognostic biomarkers to stratify PC patients. We evaluated PUMA and NOXA expression in benign and tumor regions of the prostate using immunofluorescence techniques and determined their prognostic significance in PC. **Methods:** PUMA and NOXA expression levels were quantified on six tissue microarrays (TMAs) generated from radical prostatectomy samples ($n = 285$). TMAs were constructed using two cores of benign tissue and two cores of tumor tissue from each patient. Association between biomarker expression and biochemical recurrence (BCR) at 3 years was established using log-rank (LR) and multivariate Cox regression analyses. **Results:** Kaplan–Meier analysis showed a significant association between BCR and extreme levels (low or high) of PUMA expression in benign epithelial cells ($LR = 8.831$, $p = 0.003$). Further analysis revealed a significant association between

high NOXA expression in benign epithelial cells and BCR (LR = 14.854, $p < 0.001$). The combination of extreme PUMA and high NOXA expression identified patients with the highest risk of BCR (LR = 16.778, $p < 0.001$) in Kaplan–Meier and in a multivariate Cox regression analyses (HR: 2.935 (1.645–5.236), $p < 0.001$). **Conclusions:** The combination of PUMA and NOXA protein expression in benign epithelial cells was predictive of recurrence following radical prostatectomy and was independent of PSA at diagnosis, Gleason score and pathologic stage.

Keywords: prostate cancer, predictive biomarkers, biochemical recurrence, immunofluorescence, benign glands.

2.1.2.4 Introduction

Prostate cancer (PC) remains one of the most common and lethal cancers in men worldwide. PC encompasses both low-risk disease that is slow growing and non-aggressive, and high-risk disease characterized by rapid progression and development of distant metastases [1]. Approximately a quarter of patients diagnosed with early-stage PC will harbor high-risk disease. Although prostate-specific antigen (PSA) is used as a tumor marker to screen for PC [2], this has led to an increased incidence rate of PC and possible overtreatment of low-risk disease [2]. Currently, clinicians use tumor grade, tumor volume and clinical stage to determine prognosis and guide treatment decisions [3–5]. However, these clinical parameters are still imperfect in distinguishing between low and high-risk diseases. New predictive biomarkers are needed to complement available clinical parameters to improve patient management and outcome.

PUMA and NOXA are pro-apoptotic proteins in the BH3-only subgroup of the BCL2 family and are involved in the activation of the p53-dependent apoptosis pathway [6–8]. These proteins play a key role in the inhibition of pro-survival proteins of the BCL2 family (i.e., BCL2, BCL-XL or MCL1) [9,10] that drive the activation of pro-apoptotic activators such as BAX and BAK [11] that initiate the caspase cascade [11,12].

PUMA and NOXA have demonstrated a predictive potential in several cancers such as in hepatocellular carcinoma [13,14] and gallbladder adenocarcinoma [15,16], although their value in PC has not been fully elucidated. We previously reported on a small cohort of patients that expression of PUMA and NOXA is associated with PC progression [17]. In this study, we focused on the evaluation of PUMA and NOXA protein expression in a larger cohort of RP specimens. We optimized an immunofluorescence

(IF) approach to allow proper digital quantification of protein levels to determine if PUMA and NOXA could be useful as PC biomarkers.

2.1.2.5 Results

2.1. Patient Characteristics and Clinical Parameters

The TF123 TMA series contains a non-selected retrospective cohort of patients ($n = 300$). Following extensive clinical data review, 15 were excluded from the analysis. Among the 285 eligible patients, PUMA and NOXA staining could be evaluated on benign tissues from 277 patients. None of the patients received neo-adjuvant androgen deprivation therapy prior to RP and median follow-up was 129 months. The incidence of BCR at 3 years was 27.3% (78 patients). Patient characteristics and clinical parameters are detailed in Table 1.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of the 285 patients who underwent radical prostatectomy.

Clinical parameters	TF123 TMA series
Median age at RP, years (IQR)	63 (59-67)
Median PSA at diagnosis, ng/mL (IQR)	7.0 (5.0-10.8)
Pathological TNM	
2	201
3	75
4	9
Gleason score at RP	
$\leq 3+3$	140
3+4	93
4+3	19
$\geq 4+4$	29
Unknown	4
Positive margin	95
Median follow-up, months (IQR)	129 (76-174)
Biochemical recurrence at 10 years	

No	177
Yes	108
Median time to BCR, months (IQR)	16 (4-41)
Biochemical recurrence at 3 years	
No	207
Yes	78
Median time to BCR, months (IQR)	8 (2-19)
Median time to BCR, months (IQR)	8 (2-19)

Abbreviations: RP=radical prostatectomy; PSA=prostate-specific antigen; IQR=interquartile range; TNM=tumor, lymph nodes, metastasis; BCR=biochemical recurrence.

2.2. Multiplex staining of TMA cores

The basal expression of PUMA and NOXA proteins in PC cells was determined by western blots on whole cell extracts and by IF on a TMA containing formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cell pellets of these PC cell lines (Figure S1 and Figure S5).

To characterize the localization of PUMA and NOXA expression in various tissue and cellular compartments, a multi-staining IF approach was performed on TMAs using a cocktail-based strategy incorporating antibodies used to define specific regions for analysis (CK8/18, p63 and high molecular weight cytokeratin; CK HMW) as well as antibodies against NOXA or PUMA in conjunction with a nuclear mask (DAPI) (Figure 1A). The use of a digital image protocol allowed for the selection of different regions of interest using mask algorithms [18]. Basal cell markers (p63 and CK HMW) helped to differentiate between benign and tumor tissues which facilitates the analysis of regions of interest within each core (benign or tumor). After a manual exclusion of non-appropriate regions, a second algorithm based on the epithelial mask (cytokeratin 8 and 18, CK8/18) allowed the separate analysis of stromal and epithelial compartments (luminal and basal cells, Figure 1B).

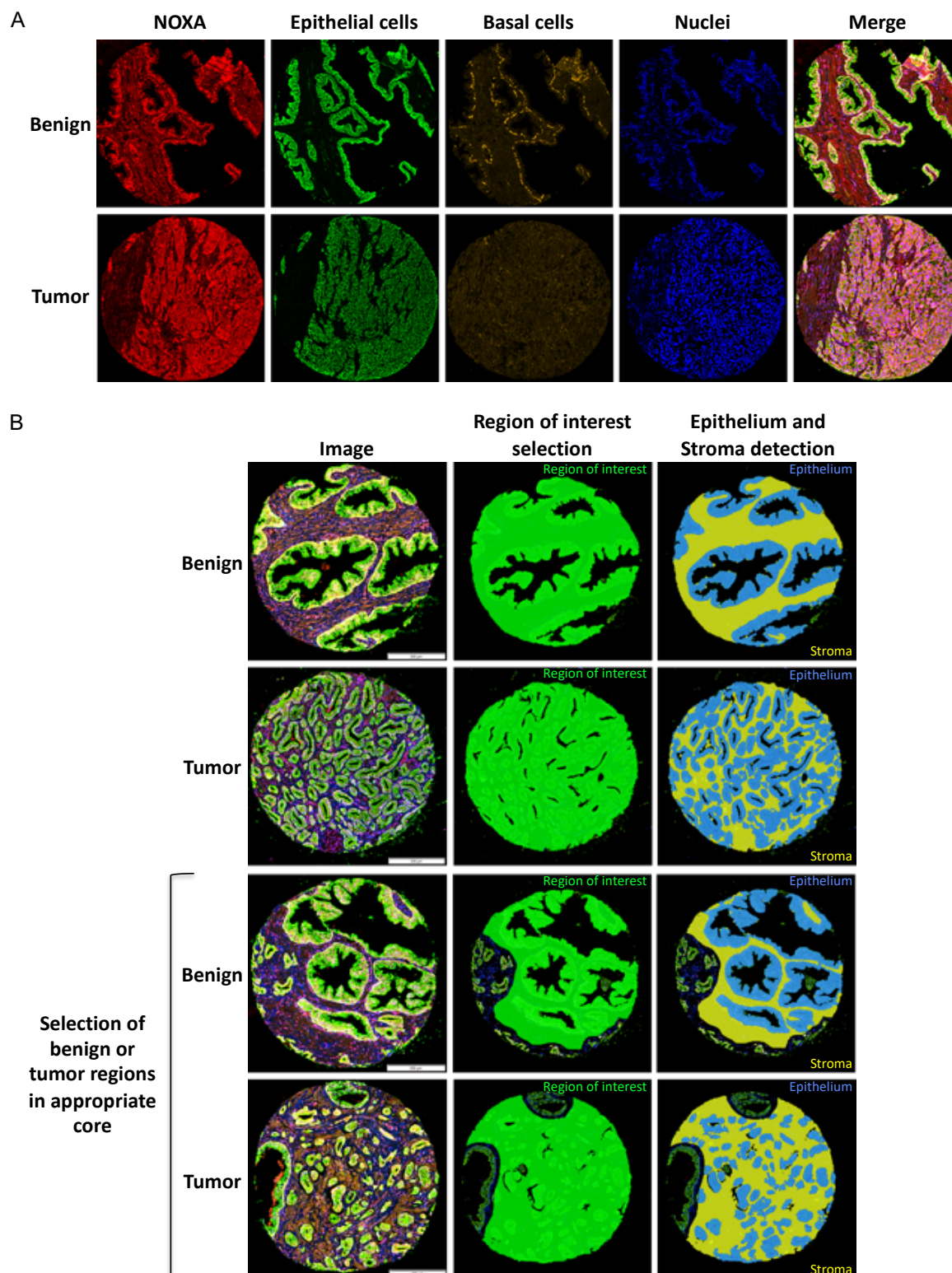


Figure 1. Digital imaging protocol for biomarker analyses. (A) Multiplex staining of TMA cores (benign and tumor) to discriminate biomarker expression (NOXA, red), epithelial luminal cells (cytokeratin CK8/18, green), basal cells (p63/CK HMW, yellow) and nuclei (DAPI, blue). Merge:

superimposed images. (B) Representative analyses of biomarker detection in different cellular compartments using VisiomorphDP software. Images in the first column represent cores after IF staining. The second and third columns illustrate the use of specific compartmental algorithms within VisiomorphDP software: region of interest (green), epithelium (blue) and stroma (yellow). For each sub-compartment, the MFI for each specific biomarker was calculate

PUMA expression was only observed in the cytoplasm of epithelial cells (Figure 2A and Figure S2A), whereas NOXA was found in both cytoplasmic and nucleic regions within epithelial cells (Figure 2B and Figure S2B). Both biomarkers were also detected in the stromal compartment. In the absence of specific markers for the stromal compartment and due to heterogeneity of the samples, data from tumor and benign cores from the same patient were pooled before analyses. Using specific settings for each biomarker, a VisiomorphDP algorithm calculated the individual MFI for PUMA and NOXA staining. For Gaussian distribution, the MFI of the protein of interest within the epithelial compartment (including benign and tumor values) was increased by 2.5-fold for PUMA (from MFI=848 to MFI=2078) and 3.5-fold for NOXA (from MFI=141 to MFI=492) (Figure 2A,B, respectively). PUMA (average MFI=1154 for epithelial cells and 958 for stromal) and NOXA (average MFI=259 for epithelial cells and 144 for stromal) staining intensity was significantly stronger in epithelial cells compared to the stromal compartment ($p < 0.0001$). Even if the tumor seemed significantly increased compared to benign glands for PUMA ($p = 0.0043$, average MFI=1129 for benign and 1180 for tumor) and NOXA ($p < 0.0001$, average MFI=247 for benign and 272 for tumor), the differences between each average expression were very similar (Figure 2A,B, respectively).

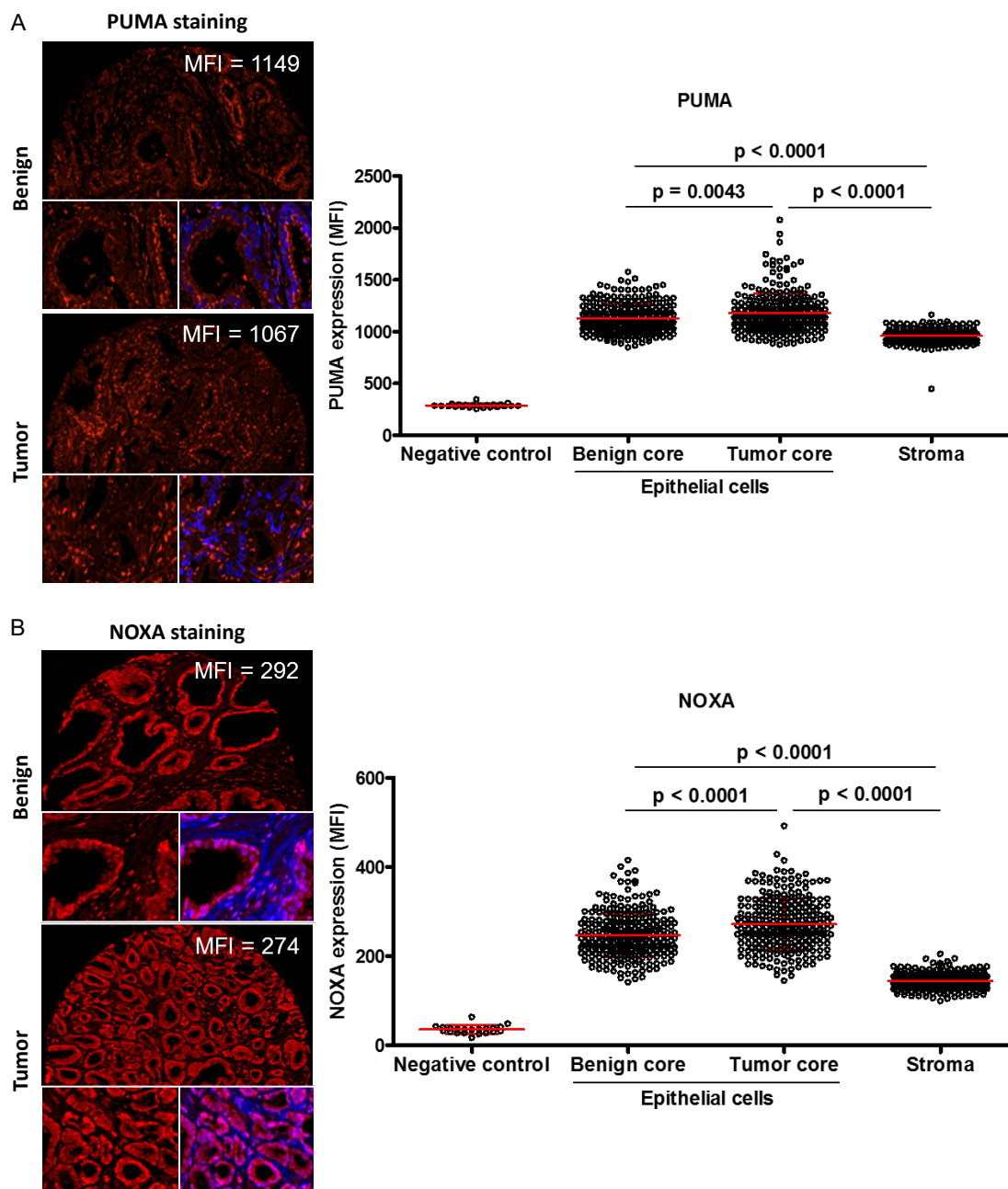


Figure 2. Compartment distribution of PUMA and NOXA expression in the prostate cancer (PC) patient cores. (A) Illustration of staining intensities (MFI) quantified by VisiomorphDP software was shown for moderate PUMA expression in one representative core of benign or tumor tissue. (B) Illustration of staining intensities (MFI) quantified by VisiomorphDP software is shown for moderate NOXA expression in one representative core of benign or tumor tissue. For each patient, expression levels were calculated using the average mean of two cores. Moderate staining was close to the median MFI intensity. Negative controls correspond to the

quantification of MFI in cores when IF was performed with only secondary antibodies. Biomarker of interest (red), nuclei (blue) and merge (DAPI + marker) (purple).

2.3. Expression of PUMA and NOXA can independently predict BCR

Based on our previous work on a small cohort of patients, expression of PUMA and NOXA was associated with increased risk of BCR (Diallo *et al.*, 2007). The median was used to dichotomize PUMA and NOXA expression data for all tissue compartments (Figure S3A,B, respectively). Using the median, only NOXA expression in benign epithelial cells was significantly associated with BCR (log rank = 5.854, $p = 0.016$). Based on Heagerty's variant to ROC-curve to produce the AUC of both PUMA and NOXA for BCR at 3 years. PUMA had an AUC of 0.53161, and NOXA had an AUC of 0.62 (data not shown). To refine our analysis, data were organized as quintiles to identify groupings most susceptible to predict BCR for each biomarker (Figure S4A,B). In benign epithelial cells, quintile analysis of PUMA expression revealed two groups that were associated with BCR: the upper (≥ 5 th quintile) and lower (< 1 st quintile) groups defined as extreme expression PUMA (log rank = 12.544, $p = 0.014$). For NOXA expression, quintile analysis demonstrated that the two-upper group (≥ 4 th quintiles) seems to be associated with BCR (log rank = 8.599, $p = 0.072$). However, no significant results were obtained in tumor cells or in the stroma for PUMA and NOXA expression (Figure S4A,B). Using these new cut-offs, extreme PUMA and high NOXA expression in benign epithelial cells were associated with high risk of BCR at 3 years (log rank = 8.831, $p = 0.003$ and log rank = 14.854, $p < 0.001$, respectively) (Figure 3A,B).

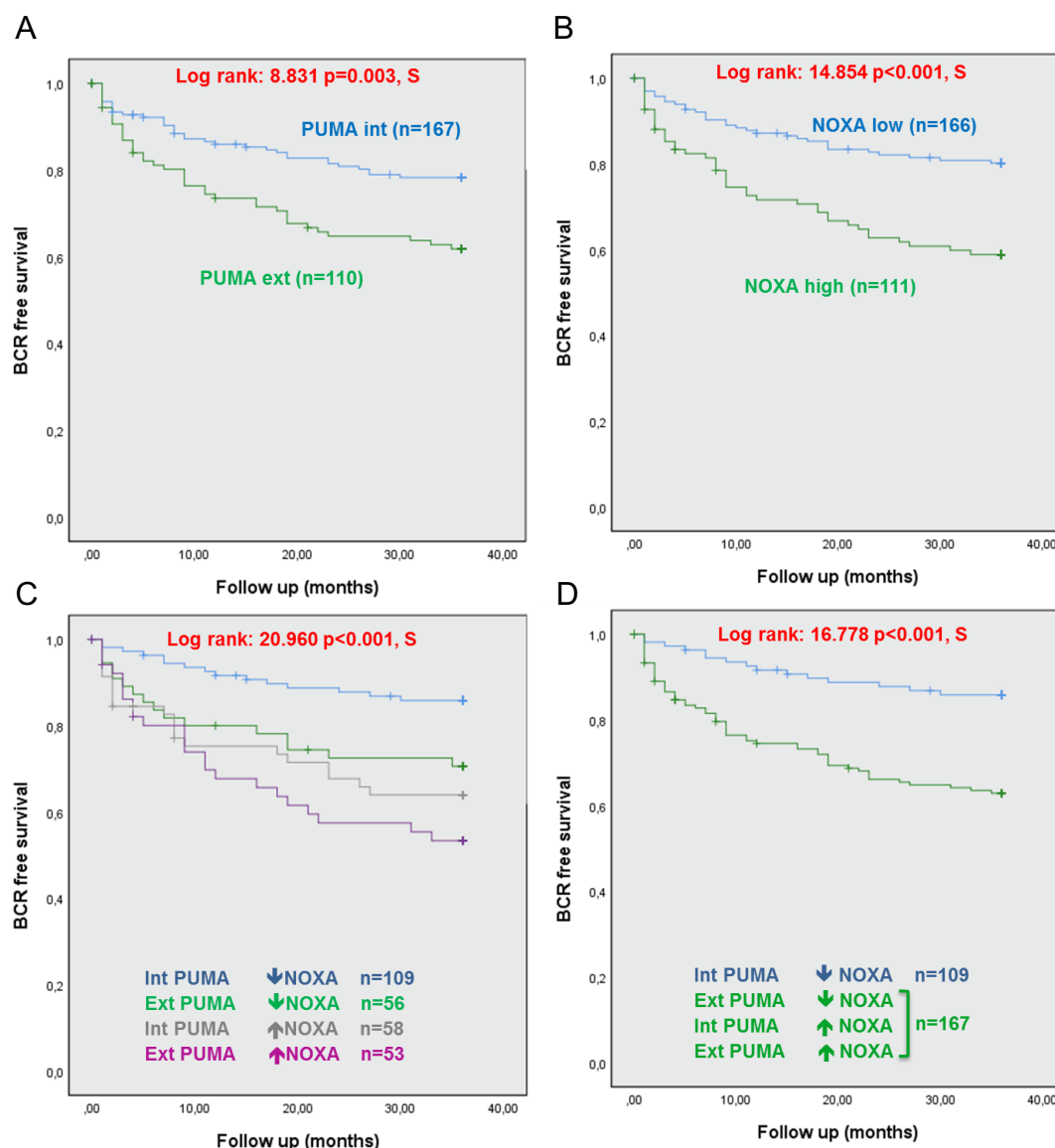


Figure 3. PUMA or NOXA expression in benign epithelium, alone or in combination, are associated with increased BCR risk at 3 years. Kaplan–Meir plots showing that (A) extreme expression of PUMA was associated to an increased risk of BCR at 3 years, (B) high NOXA expression was associated to an increased risk of BCR at 3 years, (C) combined expression of PUMA and NOXA in four groups was associated with BCR in PC patients at 3 years and (D) combined expression of PUMA and NOXA in two groups was associated with BCR in PC patients at 3 years. PUMA extreme (Ext) expression was <1st quintile and ≥5th quintile of MFI; PUMA intermediate (Int) expression was between ≥1st quintile and <5th quintile of MFI. NOXA high expression was ≥4th quintile and low expression was <4th quintile of MFI. A p-value < 0.05 was considered statistically significant (S).

Based on these results, univariate Cox regression analysis was performed for these biomarkers in benign epithelial cells only (Table 2). PUMA or NOXA dichotomized by quintile data showed a strong association with increased risk of BCR (HR = 1.953, $p = 0.004$ for PUMA and HR = 2.377, $p < 0.001$ for NOXA) (Table 2). The multivariate Cox regression analysis included following clinical markers: PSA at time of diagnosis, Gleason score at RP, margin status and pathologic stage (pTNM). Dichotomized expression of PUMA and NOXA by quintile were found to be statistically significant in a multivariable model (HR = 2.173, $p = 0.001$ for PUMA and HR = 2.280, $p = 0.001$ for NOXA) (Table 2) and identified as two independent markers with better predictive capabilities than diagnostic PSA, Gleason score and pathologic stage (Table 2).

Table 2. Univariate and multivariate Cox regression analyses of clinical parameters and PUMA/NOXA biomarker expression in benign epithelial cells to predict biochemical recurrence at 3 years.

Clinical parameters	Univariate			Multivariate with PUMA Expression			Multivariate with NOXA Expression		
	HR	(95% CI)	<i>p</i> -Value	HR	(95% CI)	<i>p</i> -Value	HR	(95% CI)	<i>p</i> -Value
Age at Dx	1.015	(0.974–1.057)	0.482	–	–	–	–	–	–
PSA at Dx	1.048	(1.017–1.081)	0.003	1.014	(0.975–1.056)	0.483	1.029	(0.989–1.070)	0.160
Gleason score	1.809	(1.473–2.221)	0.000	1.547	(1.234–1.940)	0.000	1.552	(1.252–1.923)	0.000
Margin	3.890	(2.452–6.170)	0.000	2.567	(1.556–4.234)	0.000	2.458	(1.475–4.096)	0.001
cTNM (category)	1.031	(0.587–1.810)	0.916	–	–	–	–	–	–
pTNM (category)	2.934	(2.122–4.056)	0.000	1.957	(1.286–2.978)	0.002	1.672	(1.111–2.516)	0.014
PUMA (dichotomized)	1.953	(1.241–3.075)	0.004	2.173	(1.366–3.456)	0.001	–	–	–
NOXA (dichotomized)	2.377	(1.504–3.759)	0.000	–	–	–	2.280	(1.417–3.670)	0.001

Abbreviations: Dx = diagnosis; PSA = prostate-specific antigen; cTNM = clinical tumor, lymph nodes, metastasis; pTNM = pathological tumor, lymph nodes, metastasis; HR = hazard ratio; CI = confidence interval. Gleason score categorized: $\geq 3 + 3$, $3 + 4$, $4 + 3$ or $\leq 4 + 4$. pTNM (category): 2, 3 or 4. PUMA (dichotomized): extreme expression was <1 st quintile and ≥ 5 th quintile of MFI and intermediate

expression was between 1st and 5th quintile of MFI. NOXA (dichotomized): high expression ≥ 4 th quintile and low expression < 4 th quintile of MFI. Significant results ($p < 0.05$) are indicated by bold numbers and results not included are indicated by –.

2.4. Combining expression levels of PUMA and NOXA in benign cells can predict BCR

Since PUMA and NOXA expression levels were independently predictive, we investigated their potential as combined biomarkers. Following dichotomization by quintiles, four groups were created to analyze the impact of PUMA and NOXA expression levels on BCR: intermediate PUMA with low NOXA (group 1, blue line); extreme PUMA with low NOXA (group 2, green line); intermediate PUMA with high NOXA (group 3, grey line); and extreme PUMA with high NOXA (group 4, purple line) (log rank = 20.960, $p < 0.001$, Figure 3C). Kaplan–Meier analyses showed that 3 groups presented a similar BCR risk. Hence, these three groups were merged together for subsequent analyses in which the combination of PUMA and NOXA expression consolidated their association with BCR at 3 years (log rank = 16.778, $p < 0.001$) (Figure 3D). Based on these results, univariate Cox regression analysis showed an increased BCR risk at 3 years when expression of PUMA and NOXA were combined (Table 3). This was also observed in multivariate Cox regression analysis (Table 3). More specifically, when there is an extreme PUMA or a high NOXA (HR = 2.935, $p < 0.001$), patients are at higher risk of BCR. This combination was a stronger predictor of BCR at 3 years than PSA at diagnosis, Gleason score, Margin and pTNM in multivariate analyses (Table 3).

Table 3. Univariate and multivariate Cox regression analyses of clinical parameters and combination of PUMA and NOXA expression in benign epithelial cells to predict biochemical recurrence at 3 years.

Clinical parameters	Univariate			Multivariate		
	HR	(95% CI)	<i>p</i> -value	HR	(95% CI)	<i>p</i> -value
Age at Dx	1.015	(0.974–1.057)	0.482	–	–	–
PSA at Dx	1.048	(1.017–1.081)	0.003	1.022	(0.981–1.065)	0.293
Gleason score (category)	1.809	(1.473–2.221)	0.000	1.547	(1.240–1.931)	0.000
Margin	3.890	(2.452–6.170)	0.000	2.481	(1.484–4.148)	0.001
cTNM (category)	1.031	(0.587–1.810)	0.916	–	–	–
pTNM (category)	2.934	(2.122–4.056)	0.000	1.679	(1.109–2.543)	0.014
Combination of PUMA (dichotomized) and NOXA (dichotomized)	3.055	(1.732–5.386)	0.000	2.935	(1.645–5.236)	0.000

Abbreviations: Dx = diagnosis; PSA = prostate-specific antigen; cTNM = clinical tumor, lymph nodes, metastasis; pTNM = pathological tumor, lymph nodes, metastasis; HR = hazard ratio; CI = confidence interval. PUMA (dichotomized): extreme expression was <1st quintile and \geq 5th quintile of MFI and intermediate expression was between 1st and 5th quintile of MFI. NOXA (dichotomized): high expression \geq 4th quintile and low expression <4th quintile of MFI. Significant results ($p < 0.05$) are indicated by bold numbers and results not included are indicated by –.

Based on our Kaplan–Meier and Cox regression analyses, we propose a combination of PUMA and NOXA as biomarkers to discriminate patients at the time of radical prostatectomy. Patients with lower BCR risk have an intermediate PUMA expression coupled with low NOXA expression (15 with BCR of 109 patients, 14%) in the benign tissue. In contrast, patients with extreme PUMA expression and/or high NOXA expression (59 with BCR of 167 patients, 35%) are at higher risk of early BCR.

2.1.2.6 Discussion

Biomarker discovery and validation remains critical for improving personalized care in PC and for predicting outcomes in newly diagnosed patients. The necessity to discriminate patients who need aggressive therapy from those who can be safely managed by active surveillance continues to be a challenge and biomarkers that show utility in the pre-treatment setting would be particularly useful.

Diallo et al. [17] showed that low expression levels of PUMA and NOXA in tumor cells were associated with a rapid progression towards BCR for PC patients; however, this result was reported for a small cohort of RP specimens ($n=62$) of which half had positive surgical margins. Since positive surgical margins are a known risk factor for BCR, these particular patients may have enriched the cohort creating a bias that influenced the effect of PUMA and NOXA in that analysis. In our study, we used a larger cohort ($n=285$) and improved the quantification of protein expression by IF through an automated calculation of the MFI for each biomarker to obtain a continuous value instead of using a scoring scale based on manual scoring (usually from 0 to 3) by immunohistochemistry. Our results demonstrate IF as a promising technique for biomarker quantification in a clinical setting as it uses small amounts of tissue, and digital scoring that ensures standardized, reproducible and rapid results. In addition, IF can include multiple staining for quantification of expression in specific compartments (epithelium/stroma/nuclei) and simultaneous analysis of different markers on the same tissue core. In contrast to our study, Diallo et al. [17] only determined a link between expression of PUMA and NOXA and PC progression in tumor tissue, and did not investigate the expression of both biomarkers in benign tissue.

We identified the pro-apoptotic proteins PUMA and NOXA as potential biomarkers when expressed in benign epithelial cells that discriminate PC patients with an increased risk of BCR. This observation was independent of PSA at diagnosis, Gleason score and pathologic stage. In other tumors such as in hepatocellular carcinoma [13, 14] and gallbladder adenocarcinoma [15, 16], PUMA or NOXA expression was associated significantly with poorer prognosis. However, in several other tumor models the prognostic value of PUMA or NOXA was generally inconclusive [19–23].

Recently, studies have shown the importance of studying benign tissue adjacent to the tumor. The study by Bergstorm et al (Bergstrom *et al.*, 2018) suggest that the strong expression of microseminoprotein-beta (MSMB), a PC serum biomarker, in benign tissue was associated with higher tumor grade and aggressiveness. In addition, Yang et al (B. Yang *et al.*, 2019) showed that an abnormal level of methylation in distant benign tissue from cancerous glands correlated with a more aggressive form of PC. Furthermore, Adamo et al (Adamo *et al.*, 2015) showed that tumor instructed normal tissue changes the volume and aggressiveness of tumors in prostate cancer. Together, these studies put into perspective the relevance of our study where the severity of the disease and patient outcome can potentially be determined with a biopsy specimen containing benign tissue.

2.1.2.7 Materials and Methods

4.1. Antibody Validation

PC cell lines 22Rv1, LNCaP, DU145 and PC3 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.454 µg/mL amphotericin B and 90 µg/mL gentamycin (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.2. Paraffin Processing and Embedding of Cell Line Pellets

PC cell lines were prepared as cell pellets, fixed and embedded in paraffin using HistoGel™ (Thermo Fisher Scientific) as previously described (Zietarska *et al.*, 2010) and used for the construction of cell line microarrays with a high cell density per core.

4.3. siRNA Transfection

siRNAs targeting NOXA and siRNA control (siScramble) were obtained from Dharmacon Inc. (Lafayette, CO, USA). Transient transfections were performed on DU145 cells according to manufacturer's instructions (Dharmacon Inc.). Briefly, for each siRNA, 1×10^6 cells were suspended in a solution containing

90 µL of Nucleofector Solution V (Lonza, Basel, Switzerland), 6 µL of siRNA and 96 µL of RPMI 1640 medium. Transfection was performed using the Nucleofector Program X-005 in the Nucleofector Device and transfected cells were divided in 6-well plates. Two days after transfection, cells were collected for Western blot analysis. The following siRNA sequences were used in this study: siNOXA-1 AAACUGAACUCCGGCAGA, siNOXA-2 GAACCUGACUGCAUCAAAA, siNOXA-3 AAUCUGAUUCCAAACUCU and siNOXA-4 GCAAGAACGCUCAACCGAG.

4.4. Western Blot Analysis

Confluent cells were harvested and incubated 1 h at room temperature with lysis buffer (1% Triton, 10% glycerol, 50 mM Tris, 2 mM EDTA and 150 mM NaCl) supplemented with fresh protease inhibitors. After centrifugation, protein concentrations of whole cell extracts were determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins (30 µg) were separated on 15% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Bio-Rad) gel and transferred onto nitrocellulose membrane using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). The membrane was immunoblotted with either rabbit monoclonal anti-PUMA (1:1000, EP512Y, ab33906, Abcam Inc., Cambridge, UK) or mouse monoclonal anti-NOXA (1:250, 114C307.1, MA1-41000, Thermo Fisher Scientific) antibodies. Each primary antibody was diluted in Tris-buffered saline tween 20 (TBS-T) supplemented with 5% fat-free milk powder. β-actin was used as a loading control (AC-15, ab6276, Abcam Inc.). Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). PUMA or NOXA signal quantification (relative to β-actin expression) was performed by Image Lab™ Version 6.0.0 (Bio-Rad).

4.5. Patient Cohort

Tissue microarray (TMA) TF123 is composed of tissue from 300 primary PC patients who underwent radical prostatectomy (RP) at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM, Montréal, QC, Canada) between 1993 and 2006. All subjects gave their informed consent in the PC biobank of the CHUM, affiliated to the Réseau de la recherche sur le cancer (RRCancer), for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee de la recherche du CHUM on 11 October 2012 (#2013-4072, CE 12.216-BSP). This study only included patients that were treatment naïve with at least 5 years of follow up following surgery. The cohort of patients from TMA TF1 contains an equal portion of patients with either a rapid (<1 year), intermediate (between 1 and 5 years) or no biochemical recurrence (BCR). The TF123 TMAs regroup randomly selected biobank participants between (1999–2006). The time to BCR was

defined as the time interval between the date of the RP and the date of a PSA level above 0.2 ng/mL and rising. Gleason grade was extracted from diagnostic pathology reports according to ISUP 2005.

4.6. Construction of the Tissue Microarray

The prostate specimen was processed according to standard CHUM procedures. Based on pathology report, 2–3 blocks per patients were retrieved from the institutional archives and a fresh Hematoxylin and Eosin stained slide was reviewed by an expert genito-urinary pathologist. Tumor and benign non-malignant area were indicated on the Hematoxylin and Eosin section and regions containing inflammation, PIN and atrophy were excluded. The tumor core selected was based on primary Gleason grade. When feasible, the adjacent benign tissue was taken from the same block, however when tissue was scarce the benign region was taken from an adjacent paraffin block. Using the TMArray (Pathology Devices Inc., Westminster, MD, USA) two cores (0.6 mm) of both selected areas (adjacent benign and tumor) were randomly included on two receiver blocks (1 benign and 1 tumor core per block). The resulting TMA underwent a second review by a genito-urinary-pathologist. TMA blocks were sectioned at 4 μ m TMA sections were used for subsequent IF assay (Gaudreau *et al.*, 2019).

4.7. Immunofluorescence

A semi-automatic IF protocol was used for multiplex staining. Briefly, TMA slides were deparaffinized and antigen retrieval using the Benchmark XT autostainer (VMSI). All antibodies and conditions used for this assay are summarized in Table S1 for primary antibodies and Table S2 for secondary antibodies. Primary antibodies were diluted in phosphate-buffered saline (PBS), added manually to slides and incubated at 37 °C for 60 min. The following manual steps were performed away from light. Slides were blocked with a protein block serum-free solution (DAKO, Agilent, Santa Clara, CA, USA) for 20 min. Secondary fluorescent antibodies were diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), added to slides for a 45 min. incubation at room temperature. Slides were blocked overnight with 250 μ L of PBS containing 50 μ L of Mouse-On-Mouse (MOM) blocking reagent (MKB-2213, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Antibody cocktails (CK8/18, p63 and high molecular weight cytokeratin; CK HMW) were used to detect and distinguish luminal epithelial cells and basal cells. All slides were stained with DAPI to identify nuclei. To quench tissue autofluorescence, each slide was incubated for 15 min. at room temperature with a 0.1% solution of Sudan Black B (Research organics, Cleveland, OH, USA) in 70% ethanol. Between each step, all slides were washed twice with 1X PBS. Slides were stored overnight at room temperature and scanned the following day. Negative control

slides were performed in parallel (one for PUMA and one for NOXA) and incubated only with the corresponding secondary antibodies.

All slides were scanned with a 20× Olympus Optical microscope BX61VSF (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) and visualized with OlyVIA software (Olympus). Scanned images were imported to VisiomorphDP software (Visiopharm, Hoersholm, Denmark). This software used the multiplex staining for IF to develop fully functional and semi-automated Analysis Protocol Packages (APPs) to determine expression levels of each biomarker by the mean fluorescence intensity (MFI) in each defined compartment (i.e., stroma, epithelium cytoplasm) (Labouba *et al.*, 2015).

4.8. Statistical Analysis

Statistical analysis involved data pre-processing. First, cores damaged during the staining process were eliminated from analysis. Second, tumor and benign cores that contained less than 5% of epithelial cells were eliminated. Third, identification of duplicate cores with a significant standard deviation between them were performed by GraphPad Prism software V5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA), and image control was done on VisiomorphDP software to evaluate if differences were related to technical issues, in which case the core was eliminated from the analysis. To compare biomarker expression between each compartment, the Mann-Whitney test was used. A mean fluorescence intensity (MFI) normalization compensated for the observed differences related to slide scanning and imaging in the average fluorescence intensity between each slide. Normalization to the MFI mean for each biomarker and in each compartment was achieved with the following equation example: (Mean of MFI_biomarker in epithelium (all slides of the series))/(Mean of MFI_biomarker in epithelium (slide of interest)) = Normalizing ratio. This normalizing ratio was applied to each biomarker score in the corresponding compartment: MFI_biomarker in epithelium (core of interest) × normalizing ratio = MFI_biomarker normalized in epithelium. After normalization and for each patient, the mean of the core MFI values (benign or tumor) was calculated prior to subsequent statistical analysis using SPSS Statistics 25.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The data were first analysed using the median. Then they were analyzed as quintiles to explore data trends and identify the threshold. Survival curves plotted were established using the Kaplan-Meier method, and log-rank as well as Cox regression analyses tested for statistical significance in observed differences. Univariate and multivariate (Cox regression) analyses were used to estimate the hazard ratio (HR) for each biomarker. A two-sided p-value < 0.05 was considered statistically significant.

2.1.2.8 Conclusions

In this study, we identified two potential biomarkers in tumor-associated benign epithelial cells that discriminated high-risk patients with PC, independent of PSA at diagnosis, Gleason score, surgical margin status and pathologic stage. The clinical utility of biomarkers in benign tissue has significant potential for prognostic assessment of whole RP specimens and biopsies. Given the intrinsic sampling error of prostate biopsies, PUMA and NOXA expression levels in benign tissue may eventually serve as biomarkers to improve the identification of patients who are less suitable for active surveillance.

Author Contributions: Conceptualization, S.C., B.P., V.O., A.-M.M.-M. and F.S.; methodology, S.C., B.P., V.O. and V.B.; software, S.C., V.O., Z.T. and P.I.K.; validation, S.C., B.P., V.O. and V.B.; formal analysis, S.C. and V.B.; investigation, S.C.; resources, A.-M.M.-M. and F.S.; writing—original draft preparation, S.C., B.P. and V.O.; writing—review and editing, V.B., Z.T., D.T., P.I.K., A.-M.M.-M. and F.S.; visualization, S.C. and B.P.; supervision, B.P., V.O., A.-M.M.-M. and F.S.; funding acquisition, S.C., A.-M.M.-M. and F.S.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: F.S., A.-M.M.-M. and D.T. are researchers of the CRCHUM/ICM, which receives support from the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS). D.T. is a recipient of a Junior 2 clinician-scientist award from the FRQS. This work was supported by the Movember Foundation (Movember GAP1 Tissue Biomarkers project) and a CUOG grant in prostate cancer. Biobanking was done in collaboration with the Réseau de recherche sur le cancer (RRCancer-FRQS) that is affiliated with the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). Tissue microarray construction was supported by the Terry Fox Research Institute. S.C. was supported by the Raymond Garneau Research Chair in Prostate Cancer and received funding from the Institut du cancer de Montréal and the Défi Canderel.

Acknowledgments: We thank the Molecular Pathology core facility of CRCHUM (Liliane Meunier, Gabriela Fragoso) for tissue sectioning, slides scanning, VisioMorph software and a pathology service (Feryel Azzi), and access to FA's expertise was possible thanks to the TranMedTech Institute and its primary partner, the Canada First Research Excellence Fund. We are also grateful to Jacqueline Chung and Kayla Simeone for their critical review of the manuscript and to the CRCHUM prostate cancer biobank team for their assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

2.1.2.9 References

1. Quinlan, D.M.; Partin, A.W.; Walsh, P.C. Can aggressive prostatic carcinomas be identified and can their natural history be altered by treatment? *Urology* 1995, 46, 77–82.
2. Etzioni, R.; Penson, D.F.; Legler, J.M.; di Tommaso, D.; Boer, R.; Gann, P.H.; Feuer, E.J. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002, 94, 981–990.
3. Epstein, J.I. An update of the Gleason grading system. *J. Urol.* 2010, 183, 433–440.
4. Hoogland, A.M.; Kweldam, C.F.; van Leenders, G.J. Prognostic histopathological and molecular markers on prostate cancer needle-biopsies: A review. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, 341324.
5. Egevad, L.; Judge, M.; Delahunt, B.; Humphrey, P.A.; Kristiansen, G.; Oxley, J.; Rasiah, K.; Takahashi, H.; Trpkov, K.; Varma, M.; et al. Dataset for the reporting of prostate carcinoma in core needle biopsy and transurethral resection and enucleation specimens: Recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Pathology* 2019, 51, 11–20.
6. Shibue, T.; Taniguchi, T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int. J. Cancer* 2006, 119, 2036–2043.
7. Villunger, A.; Michalak, E.M.; Coultas, L.; Mullauer, F.; Bock, G.; Ausserlechner, M.J.; Adams, J.M.; Strasser, A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003, 302, 1036–1038.
8. Zamzami, N.; Kroemer, G. p53 in apoptosis control: An introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 331, 685–687.
9. Hakisiz, P.; Kilianska, Z.M. PUMA, a critical mediator of cell death—One decade on from its discovery. *Cell Mol. Biol. Lett.* 2012, 17, 646–669.
10. Chen, L.; Willis, S.N.; Wei, A.; Smith, B.J.; Fletcher, J.I.; Hinds, M.G.; Colman, P.M.; Day, C.L.; Adams, J.M.; Huang, D.C. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* 2005, 17, 393–403.
11. Westphal, D.; Dewson, G.; Czabotar, P.E.; Kluck, R.M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1813, 521–531.

12. Wei, M.C.; Zong, W.X.; Cheng, E.H.; Lindsten, T.; Panoutsakopoulou, V.; Ross, A.J.; Roth, K.A.; MacGregor, G.R.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001, 292, 727–730.
13. Peng, S.L.; Yao, D.B.; Zhao, Y.; Xu, F.; Jia, C.J.; Xu, Y.Q.; Dai, C.L. Prognostic value of PUMA expression in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2015, 19, 38–44.
14. Ahn, C.H.; Jeong, E.G.; Kim, S.S.; Lee, J.W.; Lee, S.H.; Kim, S.H.; Kim, M.S.; Yoo, N.J.; Lee, S.H. Expressional and mutational analysis of pro-apoptotic Bcl-2 member PUMA in hepatocellular carcinomas. *Dig. Dis. Sci.* 2008, 53, 1395–1399.
15. Shu, G.S.; Lv, F.; Yang, Z.L.; Miao, X.Y. Immunohistochemical study of PUMA, c-Myb and p53 expression in the benign and malignant lesions of gallbladder and their clinicopathological significances. *Int. J. Clin. Oncol.* 2013, 18, 641–650.
16. Cai, W.; Li, Q.; Yang, Z.; Miao, X.; Wen, Y.; Huang, S.; Ouyang, J. Expression of p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) and C-myb in gallbladder adenocarcinoma and their pathological significance. *Clin. Transl. Oncol.* 2013, 15, 818–824.
17. Diallo, J.S.; Aldejmah, A.; Mouhim, A.F.; Peant, B.; Fahmy, M.A.; Koumakpayi, I.H.; Sircar, K.; Begin, L.R.; Mes-Masson, A.M.; Saad, F. NOXA and PUMA expression add to clinical markers in predicting biochemical recurrence of prostate cancer patients in a survival tree model. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13, 7044–7052.
18. Labouba, I.; Le Page, C.; Communal, L.; Kristessen, T.; You, X.; Peant, B.; Barres, V.; Gannon, P.O.; Mes-Masson, A.M.; Saad, F. Potential Cross-Talk between Alternative and Classical NF-kappaB Pathways in Prostate Cancer Tissues as Measured by a Multi-Staining Immunofluorescence Co-Localization Assay. *PLoS ONE* 2015, 10, e0131024.
19. Zhou, X.; Li, J.; Marx, C.; Tolstov, Y.; Rauch, G.; Herpel, E.; Macher-Goeppinger, S.; Roth, W.; Grulich, C.; Pahernik, S.; et al. Uncoupling of PUMA Expression and Apoptosis Contributes to Functional Heterogeneity in Renal Cell Carcinoma—Prognostic and Translational Implications. *Transl. Oncol.* 2015, 8, 480–486.

20. Sakakibara-Konishi, J.; Oizumi, S.; Kikuchi, J.; Kikuchi, E.; Mizugaki, H.; Kinoshita, I.; Dosaka-Akita, H.; Nishimura, M. Expression of Bim, Noxa, and Puma in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2012, 12, 286.
21. Zhu, H.J.; Liu, L.; Fan, L.; Zhang, L.N.; Fang, C.; Zou, Z.J.; Li, J.Y.; Xu, W. The BH3-only protein Puma plays an essential role in p53-mediated apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk. Lymphoma* 2013, 54, 2712–2719.
22. Sinicrope, F.A.; Rego, R.L.; Okumura, K.; Foster, N.R.; O'Connell, M.J.; Sargent, D.J.; Windschitl, H.E. Prognostic impact of bim, puma, and noxa expression in human colon carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 5810–5818.
23. Jansson, A.K.; Emterling, A.M.; Arbman, G.; Sun, X.F. Noxa in colorectal cancer: a study on DNA, mRNA and protein expression. *Oncogene* 2003, 22, 4675–4678.
24. Bergstrom, S.H.; Jaremo, H.; Nilsson, M.; Adamo, H.H.; Bergh, A. Prostate tumors downregulate microseminoprotein-beta (MSMB) in the surrounding benign prostate epithelium and this response is associated with tumor aggressiveness. *Prostate* 2018, 78, 257–265.
25. Yang, B.; Etheridge, T.; McCormick, J.; Schultz, A.; Khemees, T.A.; Damaschke, N.; Levenson, G.; Woo, K.; Sonn, G.A.; Klein, E.A.; et al. Validation of an epigenetic field of susceptibility to detect significant prostate cancer from non-tumor biopsies. *Clin. Epigenet.* 2019, 11, 168.
26. Adamo, H.H.; Stromvall, K.; Nilsson, M.; Halin Bergstrom, S.; Bergh, A. Adaptive (TINT) Changes in the Tumor Bearing Organ Are Related to Prostate Tumor Size and Aggressiveness. *PLoS ONE* 2015, 10, e0141601.
27. Zietarska, M.; Madore, J.; Diallo, J.S.; Delvoye, N.; Saad, F.; Provencher, D.; Mes-Masson, A.M. A novel method of cell embedding for tissue microarrays. *Histopathology* 2010, 57, 323–329.
28. Gaudreau, P.O.; Clairefond, S.; Class, C.A.; Boulay, P.L.; Chrobak, P.; Allard, B.; Azzi, F.; Pommey, S.; Do, K.A.; Saad, F.; et al. WISP1 is associated to advanced disease, EMT and an inflamed tumor microenvironment in multiple solid tumors. *Oncoimmunology* 2019, 8, e1581545.

The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/11/3187/s1>, Figure S1: Validation of PUMA and NOXA antibody specificity in PC cell lines, Figure S2: Intensities of PUMA and NOXA staining in benign and tumor epithelial cells, Figure S3: Impact of PUMA or NOXA expression on patient risk of BCR evaluated by Kaplan–Meier analyses couples with a log-rank test, Figure S4: Analyses of PUMA and NOXA potential to predict BCR using quintile methods, Figure S5: Whole Western blots of PUMA and NOXA expression in PC cell lines, Table S1: Description of primary antibodies and conditions used for IF, Table S2: Description of secondary antibodies and conditions used for IF.

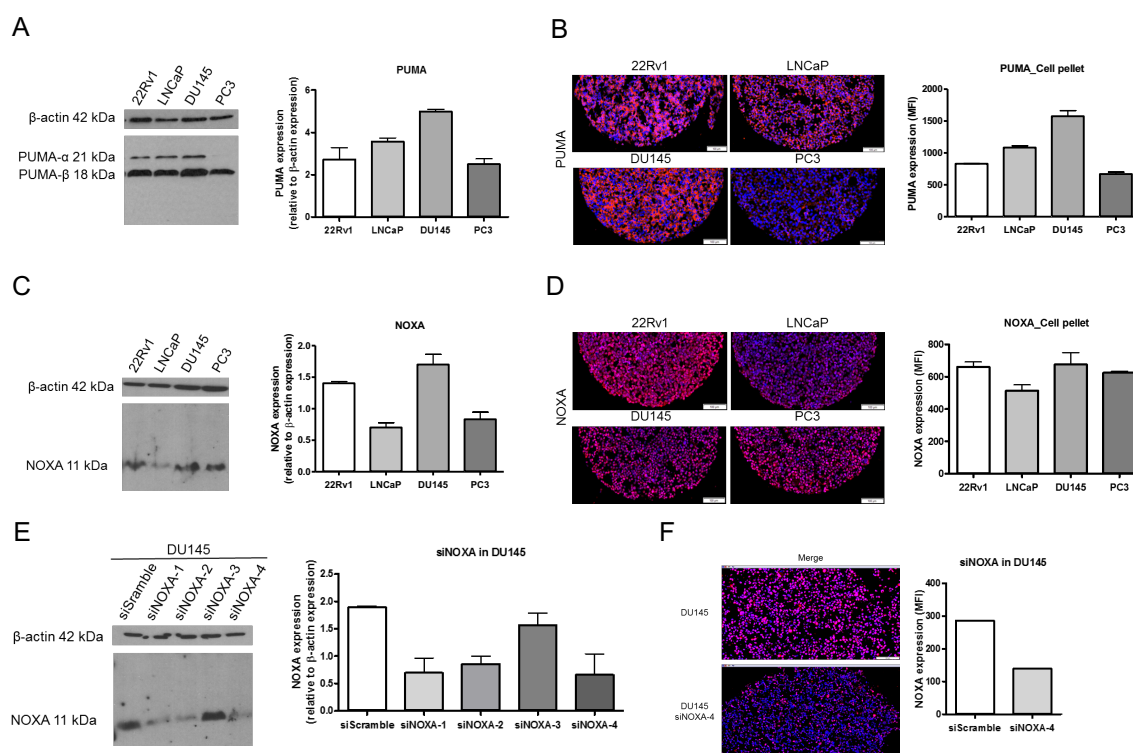


Figure S1. Validation of PUMA and NOXA antibody specificity in PC cell lines. (A) Expression of PUMA quantified in PC cell lines by western blot. The selected antibody detected only PUMA- α and PUMA- β (21 kDa and 18 kDa, respectively) [1,2]. All cell lines expressed both isoforms except PC3, which only expressed PUMA- β . PUMA (PUMA- α and PUMA- β) expression was higher in DU145 and LNCaP cell lines compared to 22Rv1 and PC3 cell lines. (B) Evaluation of PUMA expression detected in paraffin-embedded PC cell pellets by IF and quantification of staining intensities (MFI). The IF analysis (six pellet cores per cell line) of PUMA- α and PUMA- β showed relative expression patterns among cell pellets similar to those shown by western blot. (C) Expression of NOXA quantified in PC cell lines by western blot. NOXA expression was highest in

DU145, followed by 22Rv1 and PC3 cell lines. LNCaP cell line expressed the lowest level of NOXA.

(D) Evaluation of NOXA expression in FFPE PC cell pellets by IF. NOXA expression quantified in six different cores per cell line showed a relatively similar expression profile among DU145, 22Rv1 and PC3 cell lines. However, in LNCaP cells, NOXA expression levels were slightly different between western blot and IF results, and this difference could potentially be due to antibody specificity. To test antibody specificity, we introduced different anti-NOXA siRNAs to silence the NOXA protein coding gene in DU145. (E) The effects of four different anti-NOXA siRNAs were tested by western blot and their effects on NOXA expression was quantified. (F) siNOXA-4 was transfected in DU145 cells and NOXA expression was detected by IF. These results confirmed the specificity of NOXA antibody. β -actin served as loading control for quantification of western blots. Blue: nuclei, red: PUMA or NOXA. Scale bar: 100 μ m.

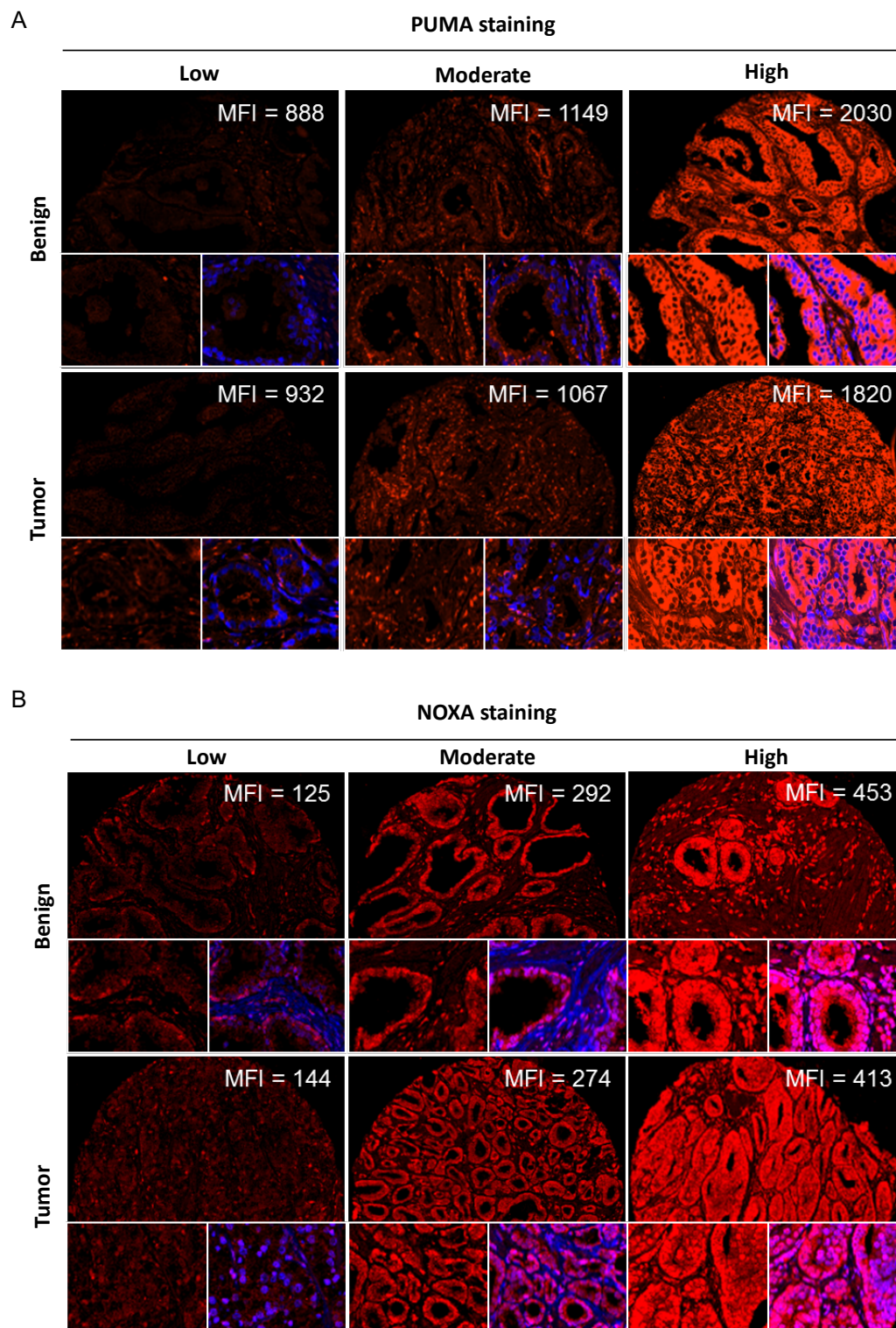


Figure S2. Intensities of PUMA and NOXA staining in benign and tumor epithelial cells. Staining intensities (low, moderate and high MFI) for (A) PUMA and (B) NOXA quantified by VisiomorphDP software are shown for each core. Low corresponded to 25th percentile intensity,

moderate was close to median MFI intensity and high was representative of the 75th percentile intensity for PUMA or NOXA expression. PUMA or NOXA (red), nuclei (blue) and merge DAPI + marker (PUMA or NOXA) (purple).

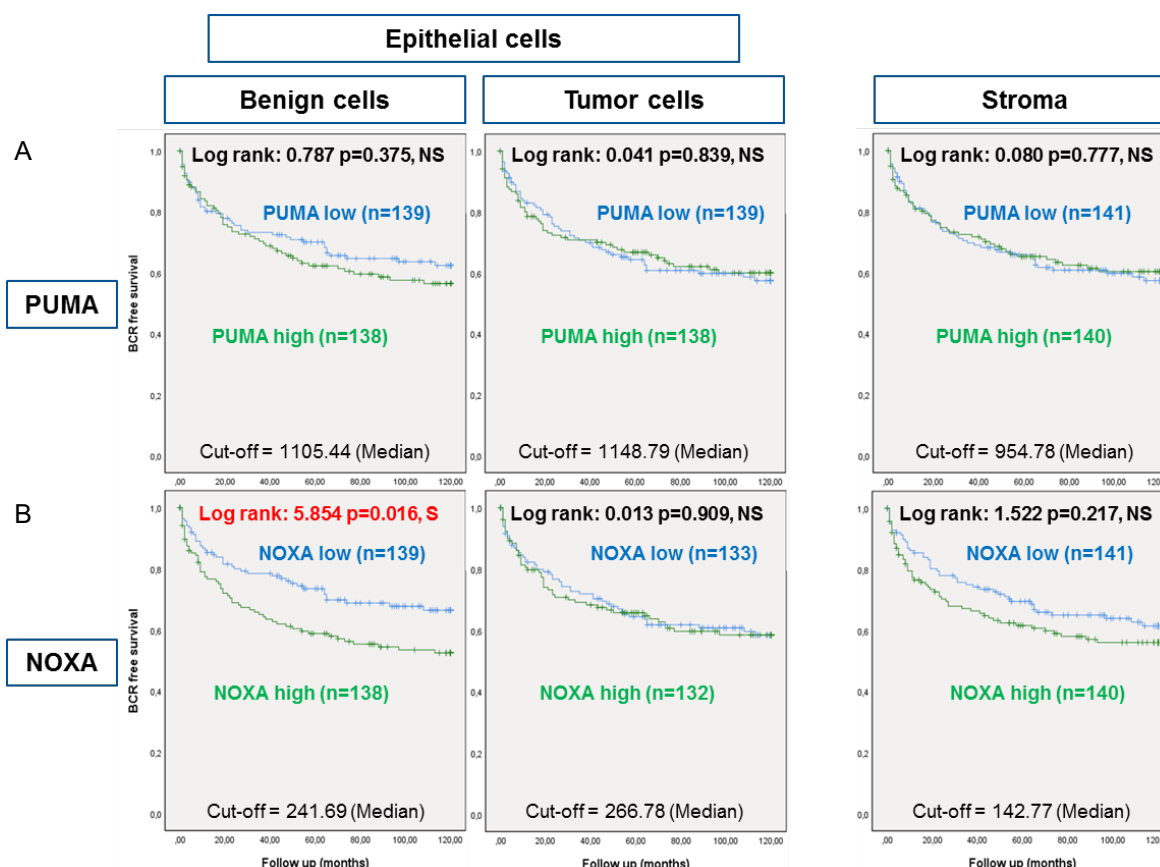
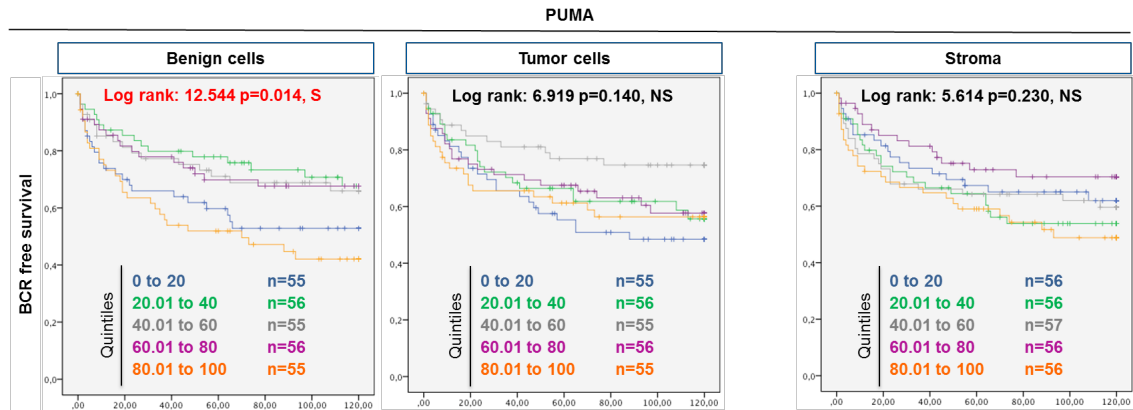


Figure S3. Impact of PUMA or NOXA expression on patient risk of BCR evaluated by Kaplan-Meier analyses coupled with a log-rank test. (A) High (over 50% of the median) and low (under 50% of the median) MFIs of PUMA in epithelial cells (benign and tumor) and in stroma. (B) High (over 50% of the median) and low (under 50% of the median) MFIs of NOXA in epithelial cells (benign and tumor) and in stroma. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. NS: not significant. S: significant.



A



B

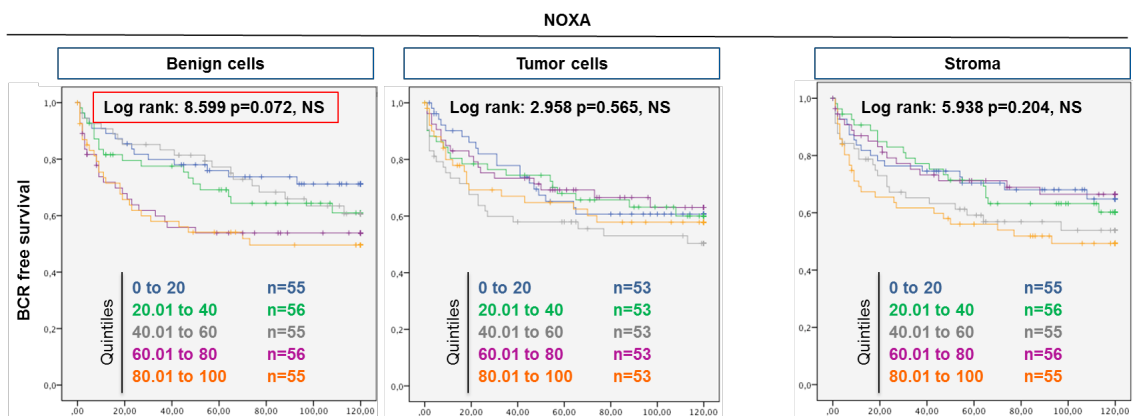
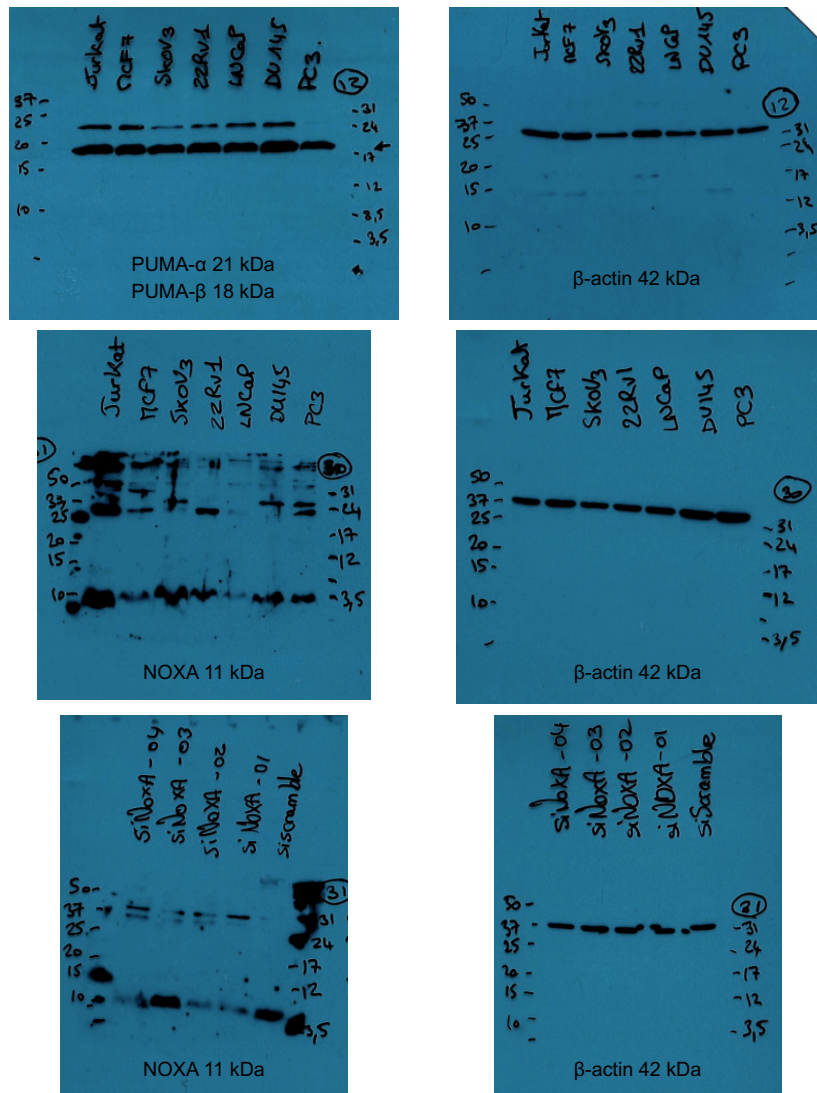


Figure S4. Analyses of PUMA and NOXA potential to predict BCR using quintile methods. Expression of (A) PUMA and (B) NOXA in benign and tumor epithelial cells, and stroma. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. NS: not significant. S: significant.

A



B

	22Rv1	LNCaP	DU145	PC3	
PUMA-alpha	0.60	1.10	1.46	0.45	
PUMA-beta	1.65	2.45	3.62	2.28	
PUMA-total	2.25	3.55	5.08	2.73	
	22Rv1	LNCaP	DU145	PC3	
NOXA	1.48	0.70	1.82	0.91	
	siScramble	siNOXA-01	siNOXA-02	siNOXA-03	siNOXA-04
NOXA	1.91	0.88	0.88	1.65	0.65

Figure S5. Whole Western blots of PUMA and NOXA expression in PC cell lines. (A) Detection of PUMA and NOXA in whole cell lysates in PC cell lines, with β -Actin as a control. (B) Intensity ratio of biomarkers for each cell line, normalized with β -Actin.

Table S1. Description of primary antibodies and conditions used for IF.

					Ventana staining	
					Antigen retrieval	Primary antibody
Markers	Company	Catalog no.	Clone	Reagent and time (min)	Dilution	Time in minutes
PUMA	Abcam	Ab33906	EP512Y	CC2, 60	1:1000	60
NOXA	Thermo Fisher Scientific	MA1-41000	114C307.1	CC1, 60	1:25	60
Epithelial mask	Thermo Fisher Scientific	MA5-14428	TS1	NA	1:100	60
	Santa Cruz Biothechnogy	sc-6259	DC-10	NA	1:100	60
	DAKO	Flex	clone EP17/30	NA	1:2	60
Basal mask	Neomarkers	Ab-1	4A4	NA	1:200	60
	Cedarlane	CLSG3668 9-05	34bE12	NA	1:50	60

Abbreviations: CC1/CC2=cell conditioning 1/2 solution (supplied by Ventana Medical Systems), CK=cytokeratin, HMW=high molecular weight, NA=not applicable.

Table S2. Description of secondary antibodies and conditions used for IF.

Marker	Catalog no.	Condition	Excitation (nm)	Emission (nm)
Cy5™ goat anti-rabbit IgG	A10523	1:250, PBS-BSA 1%	649	666
Cy5™ goat anti-mouse IgG	A10524	1:250, PBS-BSA 1%	649	666
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	A11001	1:250, PBS-BSA 1%	490	525
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG	A11008	1:250, PBS-BSA 1%	490	525
Alexa Fluor® 546 donkey anti-mouse IgG	A10036	1:250, PBS-BSA 1%	556	573
DAPI, dilactate	D3571	1:10000, PBS 1X	350	470

Abbreviations: PBS=phosphate-buffered saline, BSA=bovine serum albumin. All antibodies were purchased from Thermo Fisher Scientific.

References:

1. Nakano, K.; Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 2001, 7, 683–694.
2. Cazanave, S.C.; Mott, J.L.; Elmi, N.A.; Bronk, S.F.; Werneburg, N.W.; Akazawa, Y.; Kahraman, A.; Garrison, S.P.; Zambetti, G.P.; Charlton, M.R.; et al. JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 26591–26602.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.2 Chapitre 2 : Expression of ERBB family members as predictive markers of prostate cancer progression and mortality

2.2.1 Article #2 : Résumé en français

Titre en français : L'expression des membres de la famille ERBB comme biomarqueurs prédictifs de la progression et de la mortalité pour le cancer de la prostate.

Contexte : EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4 sont des récepteurs de croissance de la famille ERBB impliqués dans le développement des cancers épithéliaux. Certaines études ont révélé un rôle de EGFR et ERBB3 dans le développement du cancer de la prostate. Cependant, l'implication de ERBB2 et ERBB4 dans ce type de cancer reste incertaine. Dans cette étude, nous visons à évaluer l'expression de chaque membre de la famille ERBB dans les tissus prostatiques d'une grande cohorte et à déterminer leur contribution, seul ou en combinaison, en tant que biomarqueurs pronostiques. **Méthodes et Résultats :** En utilisant l'immunofluorescence couplée à des analyses d'images numériques, nous avons quantifié l'expression de EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4 sur des échantillons de prostatectomie radicale (n=285) disposés sur six micro-étalages de tissus (TMA). En combinant l'expression des protéines EGFR, ERBB2 et ERBB3 dans un modèle d'arbre décisionnel, nous avons identifié une association avec la rechute biochimique (Log rank = 25,295, $p < 0,001$), le développement de métastases osseuses (Log rank = 23,228, $p < 0,001$) et la mortalité spécifique au cancer de la prostate (Log rank = 24,586, $p < 0,001$). **Conclusions :** Notre étude a révélé que la combinaison de l'expression des membres de la famille ERBB peut aider à distinguer les patients à faible et à haut risque de rechute biochimique, de développer des métastases osseuses et de mortalité spécifique au cancer de la prostate.

2.2.2 Article #2 : Version originale soumise et sous révision à *Cancers*

Expression of ERBB family members as predictive markers of prostate cancer progression and mortality

Sylvie Clairefond ^{1,2}, Véronique Ouellet ¹, Benjamin Péant ¹, Véronique Barrès ¹, Pierre I. Karakiewicz ^{1,3}, Anne-Marie Mes-Masson ^{1,2} and Fred Saad ^{1,3,*}

¹ Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) et Institut du cancer de Montréal (ICM), Montreal, H2X 0A9, QC, Canada; sylvie.clairefond@umontreal.ca (S.C.); veronique.ouellet.chum@ssss.gouv.qc.ca (V.O.); benjamin.peant.chum@ssss.gouv.qc.ca (B.P.); veronique.barrès.chum@ssss.gouv.qc.ca (V.B.); pierre.karakiewicz@umontreal.ca (P.I.K.); anne-marie.mes-masson@umontreal.ca (A.-M.M.-M.)

² Département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montreal, H3T 1J4, QC, Canada

³ Département de chirurgie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montreal, H3C 3J7, QC, Canada

* Correspondence: fred.saad@umontreal.ca; Tel.: +1-514-890-8000 (ext. 27466)

2.2.2.1 Simple Summary

Patient diagnosed with prostate cancer will usually be offered standard treatment plan based on Gleason score, stage and prostate specific antigen (PSA) level. However, studies on other cancers have shown the importance of using biomarkers in addition to clinical and pathologic parameters to personalize therapeutic decisions. Given the important heterogeneity in the natural history of localized prostate cancer, novel prognostic biomarkers would aid in patient stratification and decision making. Here, our study shows that members of the ERBB family are markers that have high prognostic value for predicting biochemical relapse, metastasis development and even prostate cancer-related mortality. The integration of these markers into clinical practice may eventually lead to more appropriate therapeutic decisions in newly diagnosed patients and potentially reduced prostate cancer morbidity and mortality.

2.2.2.2 Abstract

Background: EGFR, ERBB2, ERBB3, and ERBB4 are growth receptors of the ERBB family implicated in the development of epithelial cancers. Studies have suggested a role for EGFR and ERBB3 in the development of prostate cancer (PC) while the involvement of ERBB2 and ERBB4 remains unclear. In this study, we evaluated the expression of all members of the ERBB family in PC tissue from a large cohort and determined their contribution, alone or in combination, as prognostic markers. **Methods:** Using immunofluorescence coupled with digital image analyses, we quantified the expression of EGFR, ERBB2, ERBB3, and ERBB4 on radical prostatectomy specimens (n=285) arrayed on six tissue microarrays. By combining EGFR, ERBB2 and ERBB3 protein expression in a decision tree model, we identified an association with biochemical recurrence (Log rank=25.295, $p<0.001$), development of bone metastases (Log rank=23.228 $p<0.001$), and cancer-specific mortality (Log rank=24.586, $p<0.001$). **Conclusions:** Our study revealed that specific protein expression patterns of ERBB family members are associated with an increased risk of PC progression and mortality.

Keywords: prostate cancer; predictive biomarkers; biochemical recurrence; development of bone metastases; cancer-specific mortality, immunofluorescence; tumor glands.

2.2.2.3 Introduction

Prostate cancer (PC) is one of the most commonly diagnosed cancer and lethal cancers in men worldwide. PC is a heterogeneous disease encompassing low (slow and non-aggressive progression) and high-risk (rapid progression) diseases. Approximatively, a quarter of patients will develop the latter characterized by the development of metastasis and subsequent death(Quinlan *et al.*, 1995). Currently, clinicians use prostate-specific antigen (PSA) levels, Gleason score, and clinical stage in an attempt to predict patient prognosis and guide treatment options(Epstein, 2010; Hoogland *et al.*, 2014). However, these clinical parameters are insufficient to reliably distinguish between low and high-risk diseases. In this context, the discovery of prognostic biomarkers to implement new indicators, is needed(Oldenhuis *et al.*, 2008).

In our laboratory, we identified several biomarkers associated with an increased risk of biochemical recurrence (BCR), such as p53 nuclear frequency(Gannon *et al.*, 2013; Labouba *et al.*, 2015), PTEN(Jamaspishvili *et al.*, 2020), CD73(Leclerc *et al.*, 2016), and PUMA-NOXA(Clairefond *et al.*, 2020).

Additional biomarkers were also identified with an increased risk of development of bone metastases, as an example nuclear p53 expression (Grosset *et al.*, 2019) and CCN3 (Dankner *et al.*, 2019) and the ability to predict PC specific mortality, such as nuclear p53 expression (Grosset *et al.*, 2019) and neutral endopeptidase CD10 (Fleischmann *et al.*, 2011). Research related to biomarkers is growing in number and several seem very promising, however, to date, no tissue biomarker is routinely used in the clinical setting.

The epidermal growth factor family of protein include EGFR, ERBB2, ERBB3, and ERBB4. Their structure is composed of an extracellular binding domain, a transmembrane domain, and an intracellular domain with tyrosine kinase activity (Dunn *et al.*, 2005). The homology of these proteins vary between 40 to 50 % with the highest homologies located in the intracellular and the lower homologies associated with the extracellular domain which provides specificity and affinity to their specific ligands (Normanno *et al.*, 2003). These transmembrane glycoproteins play an important role in multiple cellular pathways including migration, proliferation, metabolism, differentiation, and survival (Gschwind *et al.*, 2004; Holbro *et al.*, 2003; Hynes *et al.*, 2009). The mechanism of action of these receptors began with the binding of a ligand to the extracellular domain leading to a homo- or heterodimerization with another ERBB receptor leading to the subsequent auto- or trans-phosphorylation of the intracellular domain. The wide variety of downstream cellular responses is mainly due to the multiple dimerization possibilities and phosphorylation sites. Although there is no known ligand of ERBB2 and the kinase activity of ERBB3 is minimal, signal transduction of the heterodimer ERBB2-ERBB3 does occur (Roskoski, 2014).

Due to their important cellular functions, mutations, or dysregulation of ERBB expression could have dramatic effects. Several studies have highlighted their involvement in the development and progression of several human cancers (Gschwind *et al.*, 2004; Ramieri *et al.*, 2010), including PC (Y. C. Huang, Yongchang, 2011; Koumakpayi *et al.*, 2010; Lorenzo *et al.*, 2003). Indeed, high expression of EGFR is associated with poor PC patient prognosis (Di Lorenzo *et al.*, 2002; Koumakpayi *et al.*, 2010; Peraldo-Neira *et al.*, 2011). Controversial results were obtained for other members of the family (Edwards *et al.*, 2006; Hashemi *et al.*, 2016; Koumakpayi *et al.*, 2007; Koumakpayi *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 1996; Tambo *et al.*, 2009). Moreover, many studies have sought to target individual members of the ERBB family to develop anti-cancer therapies (Appert-Collin *et al.*, 2015; Gschwind *et al.*, 2004).

In this study, we quantified, for the first time, the protein expression of all four members of the ERBB family on a single tissue microarray-based cohort of radical prostatectomy specimens to determine their usefulness as prognostic markers in PC alone or in combination.

2.2.2.4 Materials and Methods

2.1 Cell lines and tissue culture conditions

Jurkat T lymphoma cells were kindly provided by Dr. Lapointe Réjean (CRCHUM), MCF-7, SKOV3, and all PC cell lines (22Rv1, LNCaP, DU145, and PC3) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Jurkat T lymphoma cell and PC cells were maintained in RPMI 1640 medium (Wisent Inc., St-Bruno, QC, CANADA), MCF-7 were grown in DMEM medium (Wisent Inc.), and SKOV3 in OSE medium (Wisent Inc.). All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 0.454 µg/mL of amphotericin B (Wisent Inc.), and 90 µg/mL gentamycin sulfate (Wisent Inc.).

2.2 Creation of cell line pellets

Cell line pellets were used as a control on tissue microarray (TMA) and prepared as previously described (Zietarska *et al.*, 2010). This method was developed to fix and embed cell suspensions in paraffin using HistoGel™ (Thermo Fisher Scientific) to ensure high cell density per core when arrayed on a TMA. The embedded cell suspensions in paraffin made it possible to reproduce the same conditions with which the patient samples were tested.

2.3 Western blot analysis

Whole-cell protein extracts were prepared using lysis buffer [1% Triton, 10% glycerol, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, and 150 mM NaCl] supplemented with fresh protease inhibitors (PIA32961, Thermo Fisher Scientific) and incubated 1 hour at room temperature, followed by centrifugation. Proteins were dosed using a Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA). A total of 30 µg of whole-cell lysate was loaded on a 6% sodium dodecyl-sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Bio-Rad) and transferred to nitrocellulose membrane using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). The membrane was immunoblotted with either rabbit monoclonal anti-EGFR (1:10 000, EP38Y, ab52894, Abcam Inc. Cambridge, UK) or mouse monoclonal anti-ERBB2 (1:750, 3B5, OP15L, Calbiochem, San Diego, CA) or rabbit monoclonal anti-ERBB3 (1:200, D22C5, #12708, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) or mouse monoclonal anti-ERBB4 (1:500, C-7, sc8050, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) antibodies. Each primary antibody was diluted in Tris-buffered saline tween 20 (TBS-T) containing 5% fat-free milk powder.

α -tubulin was used as a loading control (DM1A, sc-32293, Santa Cruz Biotechnology). Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

2.4 Patient cohort

The TF123 cohort included 300 primary PC patients who underwent radical prostatectomy at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM, Montréal, QC, CANADA) between 1993 and 2006. Each patient signed an informed consent for their participation in the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) PC biobank. The CRCHUM ethics review committee approved the study. A total of 15 patients were excluded due to preoperative hormone therapy. The time to BCR was defined as the time interval between the date of surgery and an increase in PSA levels above 0.2 ng/mL and rising, or when a decision to institute additional therapy was made.

2.5 Construction of TMA

A specialized genitourinary CHUM pathologist identified and traced out regions of cancer (Tumor: T) as well as adjacent non-cancerous areas (adjacent benign: BA) on fresh Hematoxylin and Eosin-stained slides obtained from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens. Two or three cores (0.6 mm) of BA and T were arrayed on two separate recipient blocks using a TMA array (Pathology Devices, Inc., Westminster, MD, USA). This TMA series (TF123) is composed of a total of 6 TMA blocks.

2.6 Immunofluorescence

For each biomarker, a TMA section of 4 μ m was subjected to semi-automatic immunofluorescence (IF) multiplex staining protocol using the Benchmark XT autostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). These protocols include standard steps of deparaffinization, hydration/dehydration and washes. The antigen retrieval was performed in Cell Conditioning #1 solution (#950-124, Ventana Medical Systems). Primary antibodies diluted in phosphate-buffered saline (PBS) (EGFR 1:50 or ERBB2 1:650 or ERBB4 1:50) or in signal stain antibody diluent (#8112, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) (ERBB3 1:10) and were incubated at 37°C for 60 min. Slides were blocked with a protein block serum-free solution (DAKO, Agilent, Santa Clara, CA) during 20 min. Following this step, sections were removed from the auto-stainer away from light. Secondary fluorescent antibodies (1:250, Cy5™ goat anti-rabbit IgG or Cy5™ goat anti-mouse IgG from Thermo Fisher Scientific) diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) were incubated at room temperature for 45 min. To avoid cross-reactivity, slides

were blocked overnight with a Mouse-On-Mouse blocking reagent (MKB-2213, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) diluted 1:5 in PBS.

To detect the epithelium, a cocktail of antibodies against cytokeratins 8 (1:100, TS1, MA5-14428, Thermo Fisher Scientific) and 18 (1:100, DC-10, sc-6259, Santa Cruz Biothechnogy, Dallas, TX) (used for EGFR and ERBB3) or a ready-to-use mix of cytokeratins 8 and 18 (1:2, Flex, clone EP17/30, DAKO, Agilent) (used for ERBB2 and ERBB4) were used. These antibodies were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated at room temperature for 60 min. This step was followed by incubation with a secondary fluorescent antibody, 1:250, Alexa Fluor® 546 donkey anti-mouse IgG or Alexa Fluor® 546 donkey anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific).

To properly identify basal cells, a cocktail containing antibodies against p63 (1:650, 4A4, Ab-1, Neomarkers, Fremont, CA) and high molecular weight cytokeratin (1:50, 34bE12, CLSG36689-05, Cedarlane, Fremont, CA) was applied for 45 min to the section and this was followed by secondary fluorescent antibody Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (1:250, Thermo Fisher Scientific). Following a DAPI staining, to identify nuclei, each slide was incubated for 15 min at room temperature with a 0.1% solution of Sudan Black B (Research organics, Cleveland, OH) in 70% ethanol to quench tissue autofluorescence.

Finally, slides were mounted using Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (F4680, Millipore Sigma, Burlington, MA). A negative control slide was performed in parallel (one for each biomarker) and incubated with PBS instead of the primary antibodies and processed with the appropriate secondary antibodies.

2.7 Digital image analyses and pre-processing of scoring data

All slides were scanned within 24 hours with a 20X Olympus Optical microscope BX61VSF (Olympus, Shinjuku, Tokyo, JAPON) and visualised with OlyVIA software (Olympus). Scanned images were imported to VisiomorphDP software (Visiopharm, Hoersholm, Denmark). This software allows the development of semi-automated Analysis Protocol Packages (APPs) to determine expression levels of each biomarker by the mean fluorescence intensity (MFI) in each compartment (i.e., stroma, epithelium cytoplasm)(Labouba *et al.*, 2015).

We performed quality control of the tissue cores to exclude those that were damaged during the processing or cores containing less than 5% of epithelial cells. Duplicate cores presenting with significant

differences were identified with scatter plots and Mann-Whitney test using GraphPad Prism software V6 (GraphPad, La Jolla, CA). We then reviewed the images to determine if the difference observed was due to a technical issue. In such cases, the core was excluded from the analysis. However, data were kept if no unspecific staining anomaly was noted. To properly compare all TMAs together, the mean fluorescence intensity values of each core were normalized according to a calculated ratio. This ratio results from the mean fluorescence intensity across all TMA sections for a given biomarker divided by the mean fluorescence intensity (biomarker) for a given slide.

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SPSS Statistics 25.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL). To compare biomarker expression between tissue compartments (epithelial versus stroma), a Mann-Whitney test was used. To identify the appropriate threshold for survival analyses, data were displayed as quartiles to explore data trends and identified the percentile providing the best dichotomisation for each biomarker. Survival analyses were performed using the Kaplan-Meier method coupled with a log-rank test. Univariate and multivariate Cox regression analyses were used to estimate the hazard ratios (HR) for each biomarker. A two-sided p -value < 0.05 was considered statistically significant. The construction of the decision tree model was done using R software version 3.4.3 with RPART package (R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

2.2.2.5 Results

3.1 Antibody validation in PC cell lines

Although all antibodies have already been reported in the literature, we validated their specificity in a western blot assay. We observed that all antibodies showed specific bands (Figure S1-A and Figure S2). We noted that EGFR protein levels were higher in DU145, 22Rv1, and PC3 cells when compared to the LNCaP cell line. PC cell lines only weakly express ERBB2 with greater expression in LNCaP and 22Rv1 cells. No ERBB3 expression was detected in LNCaP and PC3 cells while 22Rv1 and DU145 cells presented high expression. Finally, only the 22Rv1 cell line expressed ERBB4. Jurkat T lymphoma cells were used as control (negative) for ERBB receptors along with the well characterised MCF-7 (EGFR-, ERBB2-, ERBB3+, ERBB4+) and SKOV3 (EGFR+, ERBB2+, ERBB3 weak, ERBB4+) cell lines (Figure S1-A and Figure S2). Since in this study we use these antibodies in formalin-fixed paraffin-embedded tissue, we created, fixed, and embedded

cell pellets from these cell lines and performed an IF assay. We noted that the expression of the ERBB family members was similar to those observed in the western blot (Figure S1-B).

3.2 Patient characteristics and clinical parameters

The analyzed TF123 TMA series is composed of 285 PC patients who did not receive neoadjuvant androgen deprivation therapy before radical prostatectomy. This is a mature cohort with a median follow-up of 129 months. Demographic, histopathological, and clinical parameters are detailed in Table 1. The incidence of BCR at 5 years was 33 % (94 patients), the incidence of bone metastasis at 10 years and death specific mortality were 6.3 % (18 patients).

Table 1. Clinical and pathological characteristic of the TF123 TMA series.

Number of patients	285
Median age at RP, years (IQR)	63 (59-67)
Median PSA at diagnosis, ng/mL (IQR)	7.0 (5.0-10.8)
Pathological TNM	
2	201
3	75
4	9
Gleason score at RP	
$\leq 3+3$	140
3+4	93
4+3	19
$\geq 4+4$	29
Unknown	4
Positive margin	95
Median follow-up, months (IQR)	129 (76-174)
Biochemical recurrence at 5 years	
Number	94
Median time to BCR, months (IQR)	11 (3-26)
Bone Metastasis at 10 years	
Number	18
Median time to Bone Metastasis, months (IQR)	42 (20-83)
Overall survival	
Alive	236
Death from other cause	31
Death from PC	18
Median time to Death specific PC mortality, months (IQR)	68 (49-150)

Abbreviation: TMA=tissue microarray, RP=radical prostatectomy, PSA=prostate-specific antigen, IQR=interquartiles ranges, TNM=tumor, lymph nodes, metastasis, RP=radical prostatectomy, BCR=biochemical recurrence, PC=prostate cancer.

3.3 ERBB family member's expression in human PC specimens

To assess the usefulness of the ERBB family members as PC prognostic markers, we performed a multiplex IF assay incorporating one receptor (red: EGFR, ERBB2, ERBB3 or ERBB4) with specific masks to define the epithelium (yellow: CK8/18), the basal cells (green: p63/CKHMW: present in benign/normal prostate glands) and the nucleus (blue: DAPI) on the TF123 TMA series.

As expected, EGFR, ERBB2, ERBB3, and ERBB4 presented a membrane and cytoplasmic localisation in the epithelium of both T (Figure 1-A) and BA (data not shown) tissue cores. EGFR expression was significantly higher in BA compared to T tissue ($p < 0.0001$, MFI=705 vs MFI=654, Figure 1-B) as opposed to ERBB2 ($p = 0.0230$, MFI=112 vs MFI=115, Figure 1-C) and ERBB3 ($p < 0.0001$, MFI=1126 vs 1163, Figure 1-D). Since we observed a low level of expression of ERBB4 in the PC cell lines and their derivatives, and to avoid any waste of material, we decided to stain only one TMA slide with ERBB4. Despite the specificity of the antibody used, ERBB4 did not show a clear signal compared to background staining and had an MFI similar to the negative control (Figure 1-E). Therefore, we did not include the analyses with ERBB4. We also noted that the expression of all receptors was significantly weaker in the stroma when compared to the epithelium (Figure 1-B to E).

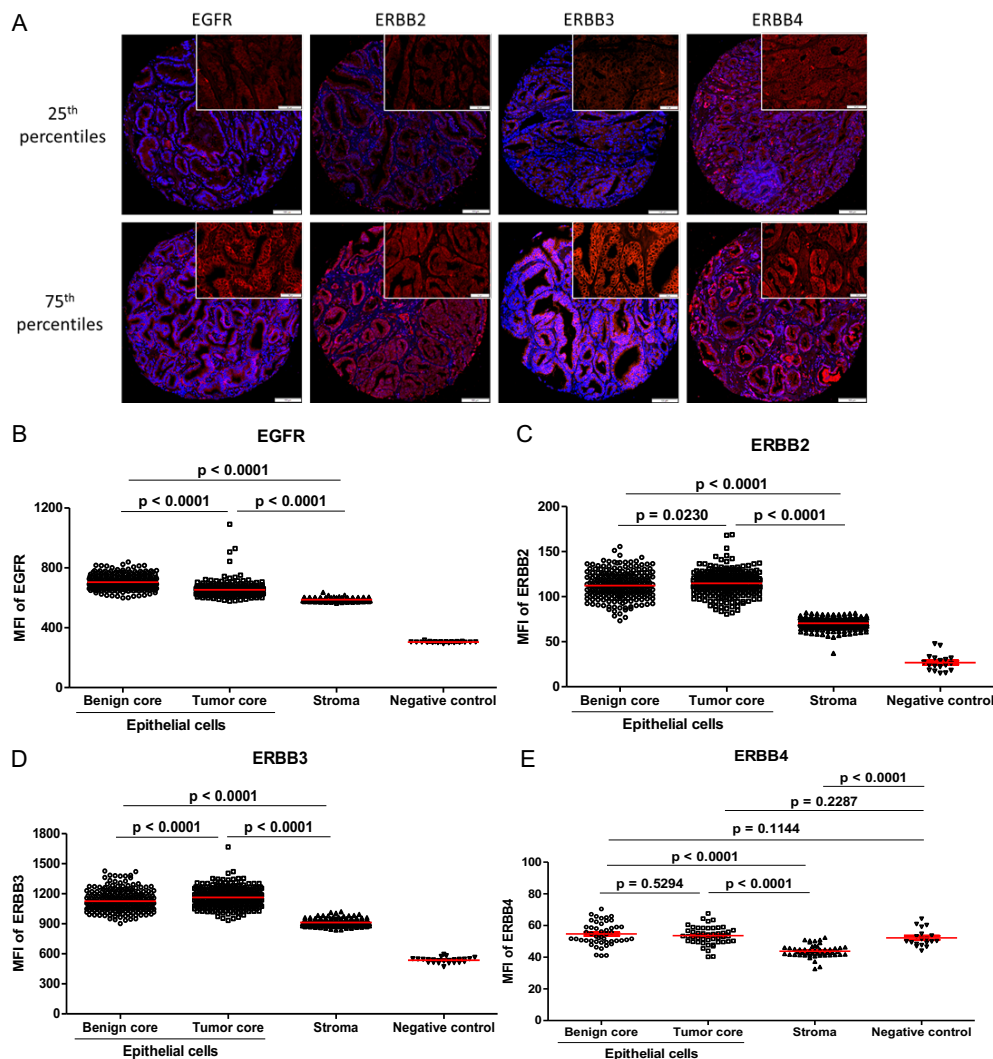


Figure 1. Expression for all ERBB family members in the TF123 TMA series. (A) Representative staining of the 25th and 75th percentiles for each protein in epithelial cells of tumor cores. Distribution of (B) EGFR, (C) ERBB2, (D) ERBB3, and (E) ERBB4* expression in the whole PC patient cohort. DAPI (blue) and protein of interest (red). The scale bar at 100 μ m is for the whole image and the scale bar at 50 μ m for enlarged view. * for ERBB4 only one TMA slide was stained and analyzed.

3.4 EGFR, ERBB2, and ERBB3 expression is associated with an increased risk of BCR at 5 years

To quantitate the expression of each biomarker, we performed digital image analysis of each core using an algorithm that detected only the epithelial compartment. This algorithm targets the region of epithelial cells stained by the CKs cocktail used for the detection of epithelial cells then measures the fluorescence intensity in the channel corresponding to the marker of interest.

To assess the prognostic capacity of the ERBB, we first evaluate if they were associated with BCR (<5 years). To determine the appropriate threshold for each biomarker to dichotomize their expression levels, we used the quartiles methods. Using Kaplan-Meier curves coupled with a log-rank test, we observed an increased risk of BCR with the high expression of EGFR (75th percentile defined as EGFR^{high}; log rank=5.861, p=0.015) (Figure 2-A) while ERBB2 did not show such significance (under 50th percentile defined ERBB2^{low}; log rank=2.441, p=0.118) (Figure 2-B). Finally, the low expression of ERBB3 was also an indicator of BCR (25th percentile defined as ERBB3^{low}; log rank=3.768, p=0.052) (Figure 2-C).

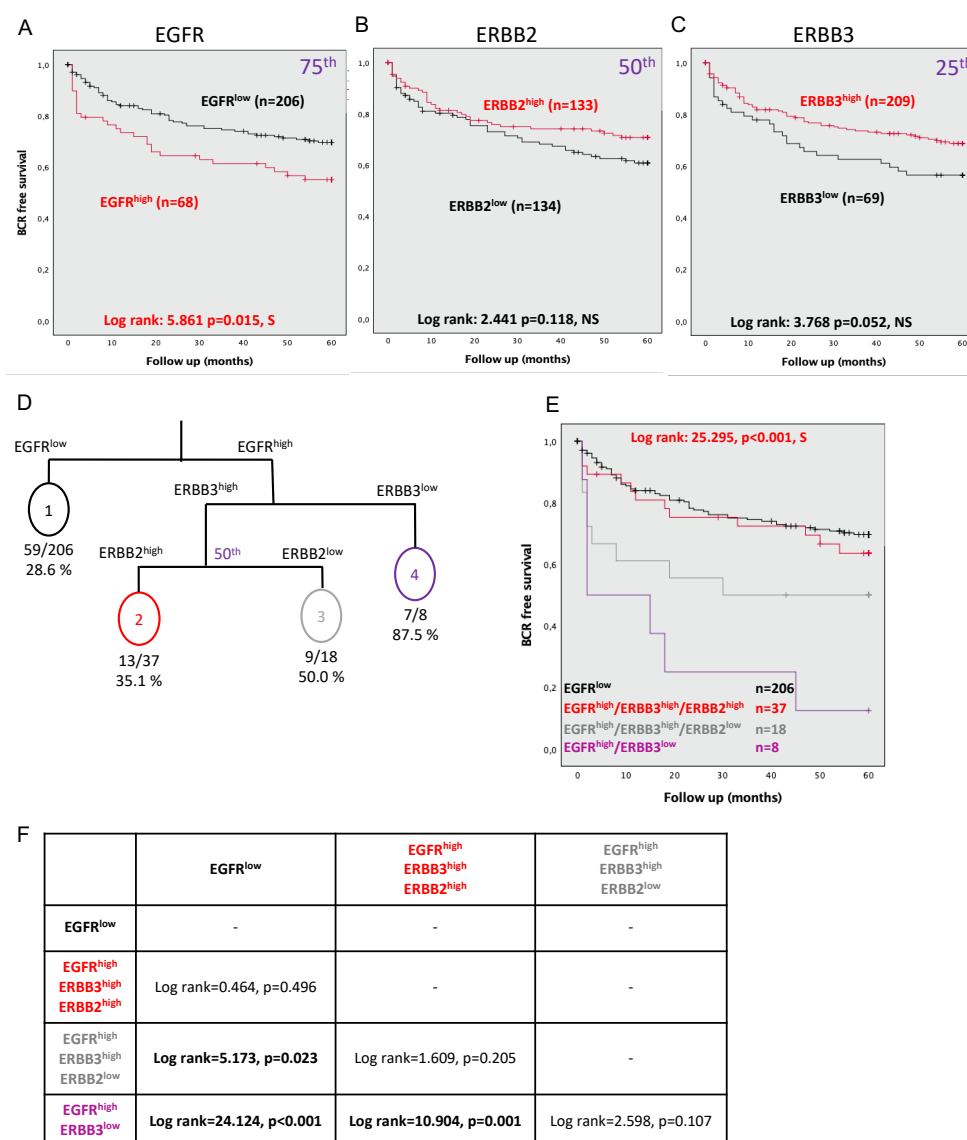


Figure 2. Association of proteins expression in epithelial cells of tumor cores with biochemical recurrence evaluated at 5 years. Kaplan-Meier curves for (A) EGFR with a cutoff at 75th percentiles, (B)

ERBB2 with a cutoff using the median, and (C) ERBB3 with a cutoff at 25th percentiles. (D) Survival tree including EGFR, ERBB2, ERBB3, and BCR in an RPART model. (E) Kaplan-Meier plot combines EGFR, ERBB2, and ERBB3 expression. (F) Summary table of log rank between each of the conditions of expression of ERBB members. Significance is indicated by log-rank test. $p < 0.05$ was considered as significant; NS, not significant; S, significant.

Univariate Cox regression analyses also demonstrated that EGFR^{high} in continuous (HR=1.006, CI [1.003 – 1.009] $p=0.001$), or dichotomized (HR=1.703, CI [1.0097 – 2.644] $p=0.018$) values, as well as dichotomized ERBB3^{low} values (HR=0.650, CI [0.418 – 1.011] $p=0.056$) showed an association with an increased risk of BCR (<5 years) (Table 2). Continuous ERBB2 and ERBB3 or dichotomized ERBB2 expression values failed to show significance. However, ERBB family members were not independent of known prognostic clinical parameters (Table 2).

Table 2. Univariate and Multivariate Cox regression analyses of single receptors using the BCR at 5 years as an endpoint.

	Univariate			Multivariate with dichotomized EGFR expression			Multivariate with dichotomized ERBB2 expression			Multivariate with dichotomized ERBB3 expression		
	HR [95% CI]	p-value		HR [95% CI]	p-value		HR [95% CI]	p-value		HR [95% CI]	p-value	
Age at Dx	0.999 [0.963-1.035]	0.942	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSA at Dx	1.061 [1.033-1.089]	0.001	1.032	[0.996-1.069]	0.086	1.036	[1.000-1.073]	0.048	1.036	[1.001-1.073]	0.043	
Gleason score (4 categories)	1.852 [1.549-2.214]	0.001	1.530 [1.237-1.891]	0.001	1.464 [1.179-1.819]	0.001	1.517 [1.231-1.869]	0.001	1.517 [1.231-1.869]	0.001	0.001	
Margin	3.349 [2.216-5.062]	0.001	2.617 [1.655-4.139]	0.001	2.479 [1.560-3.939]	0.001	2.531 [1.596-4.015]	0.001	2.531 [1.596-4.015]	0.001	0.001	
pTNM (4 categories)	2.884 [2.133-3.900]	0.001	1.555 [1.047-2.309]	0.029	1.683 [1.131-2.503]	0.010	1.578 [1.065-2.340]	0.023	1.578 [1.065-2.340]	0.023	0.023	
EGFR_Tumor_Continuous	1.006 [1.003-1.009]	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EGFR_Tumor_Dichotomized 75 th	1.703 [1.097-2.644]	0.018	1.267	[0.781-2.057]	0.337	-	-	-	-	-	-	-
ERBB2_Tumor_Continuous	0.987 [0.970-1.004]	0.122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERBB2_Tumor_Dichotomized 50 th *	0.716 [0.468-1.095]	0.123	-	-	-	0.787	[0.503-1.232]	0.295	-	-	-	-
ERBB3_Tumor_Continuous	0.999 [0.996-1.001]	0.196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERBB3_Tumor_Dichotomized 25 th	0.650 [0.418-1.011]	0.056	-	-	-	-	-	-	0.856	[0.856-1.367]	0.515	

Abbreviation: Dx=diagnosis, PSA=prostate-specific antigen, pTNM=pathological tumor, lymph nodes, metastasis, HR=hazard ratio, CI=confidence interval.

EGFR_Tumor_Dichotomized designed high expression (over 75%, EGFR^{high}) and low (under 75%, EGFR^{low}) MFI. ERBB2_Tumor_Dichotomized designed high expression (over 50% of the median, ERBB2^{high}) and low (under 50% of the median, ERBB2^{low}) MFI. ERBB3_Tumor_Dichotomized designed high expression (over 25%, ERBB3^{high}) and low (under 25%, ERBB3^{low}) MFI. $p\text{-value} < 0.05$ is shown in bold, $p\text{-value}$ between $p \geq 0.05$ and $p < 0.10$ is presented in italic. The symbol ‘-’ indicates that the parameter was not included in the model.

3.5 Combining expression levels of EGFR, ERBB2, and ERBB3 predict BCR at 5 years

Since all ERBB family members can dimerize with each other, we evaluated how combinations could be informative of BCR. Therefore, we develop a decision tree model including dichotomized EGFR, ERBB2 and ERBB3 expression values. Four ERBB status groups were defined (Figure 2-D). The decision tree indicated, within a receptor status group, the number of patients with a BCR event. Thereby, we obtain a percentage reflecting the probability to experience the event within the receptor status group. To better represent differences among these newly identified receptor status groups we performed a Kaplan-Meier analysis and observed a significant overall difference (Log rank=25.295, $p<0.001$) (Figure 2-E). Despite significant overall results, some groups are only distinct from each other when compared 2 by 2 and not from all of the other groups (Figure 2-F).

We performed univariate Cox regression analysis using the four ERBB groups and we noted a significant risk of BCR (HR=1.609, CI [1.276 – 2.027] $p<0.001$) (Table 3). More importantly, patients with PC tissue expressing EGFR^{high}, ERBB3^{high} and ERBB2^{low} present a higher 2.189 fold risk of experiencing a BCR that increased to a 5.455 fold higher risk when high ERGF and low ERBB3 expressions were present. In univariate analyses, the hazard ratio was greater than all clinical parameters. However, in the multivariate analyses, these status groups were not shown to be independent of the clinical parameters (HR=1.204, CI [0.930 – 1.559] $p=0.158$) (Table 3).

Table 3. Univariate and Multivariate Cox regression analyses of ERBBs status groups using the BCR at 5 years as an endpoint.

		Univariate		Multivariate		
		HR [95% CI]	p-value	HR [95% CI]	p-value	
Age at Dx		0.999	[0.963-1.035]	0.942	-	-
PSA at Dx		1.061	[1.033-1.089]	0.001	1.029	[0.993-1.067] 0.113
Gleason score		1.852	[1.549-2.214]	0.001	1.495	[1.205-1.856] 0.001
Margin		3.349	[2.216-5.062]	0.001	2.508	[1.582-3.976] 0.001
pTNM (category)		2.884	[2.133-3.900]	0.001	1.559	[1.044-2.329] 0.030
Category	Combined all ERBB members	1.609	[1.276-2.027]	0.001	1.204	[0.930-1.559] 0.158
	EGFR ^{low}	1.000	-	-	1.000	-
	EGFR ^{high} /ERBB3 ^{high} /ERBB2 ^{high}	1.231	[0.675-2.244]	0.498	1.197	[0.622-2.303] 0.591
	EGFR ^{high} /ERBB3 ^{high} /ERBB2 ^{low}	2.189	[1.085-4.417]	0.029	1.122	[0.514-2.449] 0.773
	EGFR ^{high} /ERBB3 ^{low}	5.455	[2.478-12.011]	0.001	2.202	[0.915-5.297] 0.078

Abbreviation: Dx=diagnosis, PSA=prostate-specific antigen, cTNM=clinical tumor, lymph nodes, metastasis, pTNM=pathological tumor, lymph nodes, metastasis, HR=hazard ratio, CI=confidence interval.

EGFR_Dichotomized designed high expression (over 75%, EGFR^{high}) and low (under 75%, EGFR^{low}) MFI. ERBB2_Dichotomized designed high expression (over 50% of the median, ERBB2^{high}) and low (under 50% of the median, ERBB2^{low}) MFI. ERBB3_Dichotomized designed high expression (over 25%, ERBB3^{high}) and low (under 25%, ERBB3^{low}) MFI. Significant results (p-value<0.05) are indicated by bold numbers and results not included are indicated by -.

3.6 Expression of EGFR, ERBB2, and ERBB3 can predict bone metastasis development at 10 years

Another important endpoint in PC is the development of bone metastasis which is also recognized as a surrogate for PC mortality. We observed that both EGFR^{high} (log rank=8.103, p=0.004) and ERBB2^{low} (log rank=4.539, p=0.033) were significantly associated with an increased risk of developing bone metastasis (Figure 3-A and 3-B). However, ERBB3 expression did not confer risk for bone metastasis development (log rank=0.889, p=0.346) (Figure 3-C).

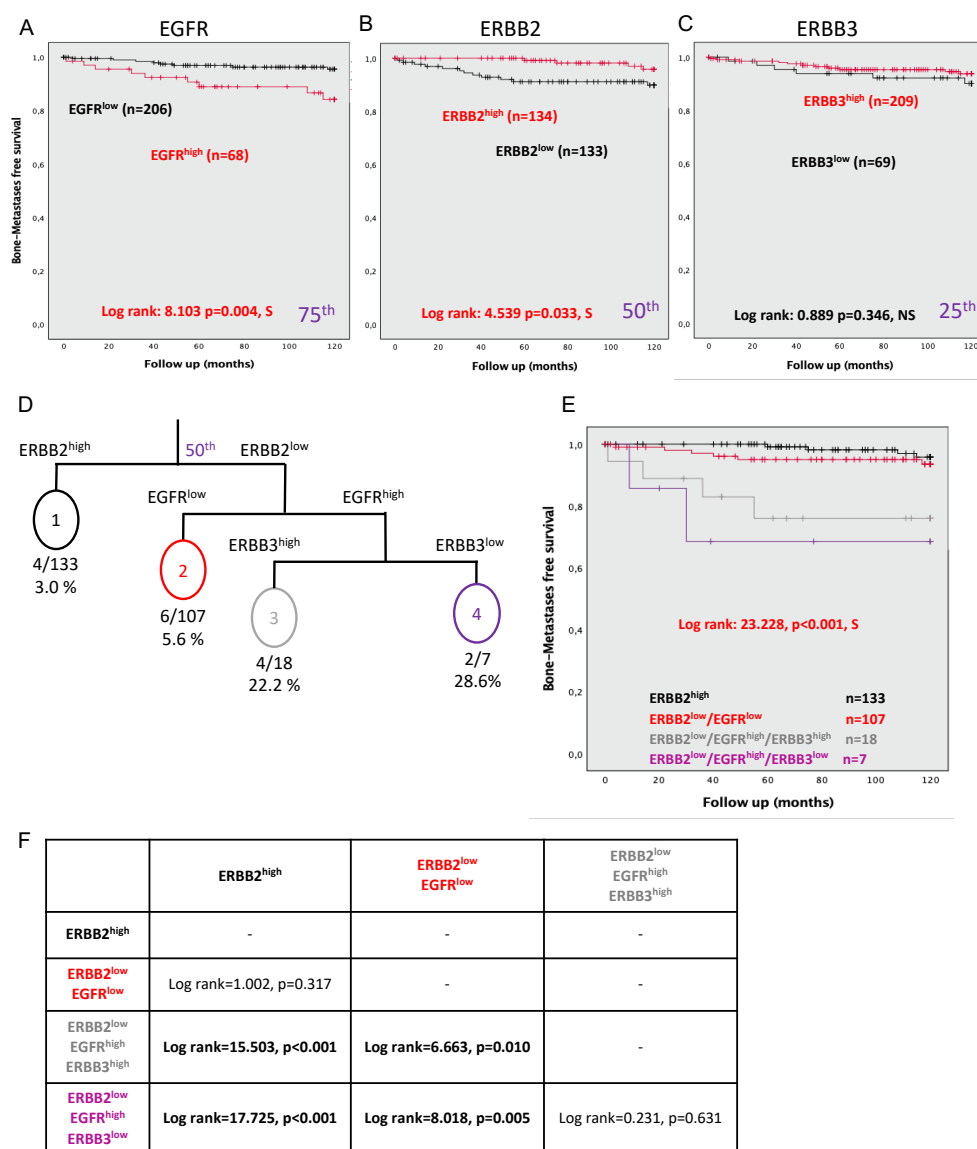


Figure 3. Association of protein expression in epithelial cells of tumor cores with the development of bone metastases at 10 years. Kaplan-Meier curves for (A) EGFR with a cutoff at 75th percentiles, (B) ERBB2 with a cutoff using the median and (C) ERBB3 with a cutoff at 25th percentiles. (D) Survival tree including EGFR, ERBB2, ERBB3, and bone metastases in an RPART model. (E) Kaplan-Meier plot combines EGFR, ERBB2, and ERBB3 expression. (F) Summary table of log rank between each of the conditions of expression of ERBB members. Significance is indicated by log-rank test. $p < 0.05$ was considered as significant; NS, not significant; S, significant.

Patients with EGFR^{high} in their PC tissue (continuous or dichotomized values) showed an increased risk of developing bone metastasis when performing Cox regression analyses (Table 4); a risk that reached 3.462 (CI [1.404 – 1.016] p=0.008) fold when EGFR expression is dichotomized. In contrast, ERBB2^{high} in PC tissue is associated with a lower risk for bone metastasis (HR=0.312, CI [0.101 – 0.969] p=0.044) and to a lesser extent ERBB3^{high} (continuous values) with a protective effect (HR=0.994, CI [0.989 – 1.00] p=0.037) (Table 4).

Table 4. Univariate Cox regression analyses of ERBBs using the development of bone metastasis at 10 years as an endpoint.

		Univariate	
		HR [95% CI]	p-value
Age at Dx		0.987	[0.907-1.073]
PSA at Dx		1.059	[1.002-1.119]
Gleason score		3.704	[2.304-5.955]
Margin		3.290	[1.275-8.489]
pTNM (category)		7.490	[3.830-14.647]
EGFR_Continuous		1.012	[1.007-1.016]
EGFR_Dichotomized		3.642	[1.404-9.444]
ERBB2_Continuous		0.976	[0.939-1.016]
ERBB2_Dichotomized		0.312	[0.101-0.969]
ERBB3_Continuous		0.994	[0.989-1.000]
ERBB3_Dichotomized		0.622	[0.230-1.683]
Category	Combined all ERBB members	2.036	[1.438-2.881]
	ERBB2 ^{high}	1.000	-
	ERBB2 ^{low} /EGFR ^{low}	1.897	[0.535-6.722]
	ERBB2 ^{low} /EGFR ^{high} /ERBB3 ^{high}	9.273	[2.311-37.197]
	ERBB2 ^{low} /EGFR ^{high} /ERBB3 ^{low}	14.774	[2.687-81.237]

Abbreviation: Dx=diagnosis, PSA=prostate-specific antigen, cTNM=clinical tumor, lymph nodes, metastasis, pTNM=pathological tumor, lymph nodes, metastasis, HR=hazard ratio, CI=confidence interval.

EGFR_Dichotomized designed high expression (over 75%, EGFR^{high}) and low (under 75%, EGFR^{low}) MFI. ERBB2_Dichotomized designed high expression (over 50% of the median, ERBB2^{high}) and low (under 50% of the median, ERBB2^{low}) MFI. ERBB3_Dichotomized designed high expression (over 25%, ERBB3^{high}) and low (under 25%, ERBB3^{low}) MFI. Significant results (p-value<0.05) are indicated by bold numbers.

3.7 Combining expression levels of EGFR, ERBB2, and ERBB3 can predict bone metastasis development

By incorporating EGFR, ERBB2 and ERBB3 expression in a decision tree model (Figure 3-D), four ERBB receptor status groups could be developed to segregate patients based on the risk of developing bone metastasis. Kaplan-Meier analyses performed using these groups revealed an overall log rank of 23.228 with a $p < 0.001$ (Figure 3-E). The Kaplan-Meier highlights two distinct patient profiles ($ERBB2^{high}/ERBB2^{low}/EGFR^{low}$) at risk for the development of bone metastases compared to two groups ($ERBB2^{low}/EGFR^{high}/ERBB3^{high}$ and $ERBB2^{low}/EGFR^{high}/ERBB3^{low}$) (Figure 3-F). Also, an overall Cox regression analysis, taking into account the combination of all ERBB receptors, showed an increased risk of developing bone metastasis ($HR=2.036$, $p < 0.001$) (Table 4). More specifically, our results suggest that patients with tumors expressing $ERBB2^{low}$ and both $EGFR^{high}$ and $ERBB3^{high}$ presented a risk that was increased 9.273 fold ($CI [2.311 - 37.197]$, $p=0.002$). The risk of developing bone metastasis reached 14.774 ($CI [2.387 - 81.237]$ $p=0.002$) for patients expressing $ERBB2^{low}$ and $ERBB3^{low}$ coupled with $EGFR^{high}$ and overperforms all clinical parameters.

3.8 Expression of EGFR, ERBB2, and ERBB3 can predict PC specific mortality

The TF123 TMA series is richly annotated and the long-term follow-up allows the evaluation of the ultimate PC endpoint. While $EGFR^{high}$ presents a trend while failing to reach significance (log rank=2.741, $p=0.098$) (Figure 4-A) both $ERBB2^{low}$ and $ERBB3^{low}$ were significantly associated with PC specific mortality (log rank=4.549, $p=0.033$ and log rank=4.439, $p=0.035$, respectively) (Figure 4-B and 4-C). Cox regression analysis demonstrated that patients with $EGFR^{high}$ or those with $ERBB3^{low}$ (continuous values) in their PC tissue presented a greater risk of dying from PC ($HR=1.017$, $CI [1.010 - 1.023]$, $p < 0.001$, and $HR=0.991$, $CI [0.985 - 0.997]$, $p=0.002$, respectively). This was also observed for $ERBB2^{low}$ or $ERBB3^{low}$ (dichotomized values) ($HR=0.312$, $CI [0.101 - 0.968]$, $p=0.044$ and $HR=0.373$, $CI [0.373 - 0.969]$, $p=0.043$, respectively) (Table 5).

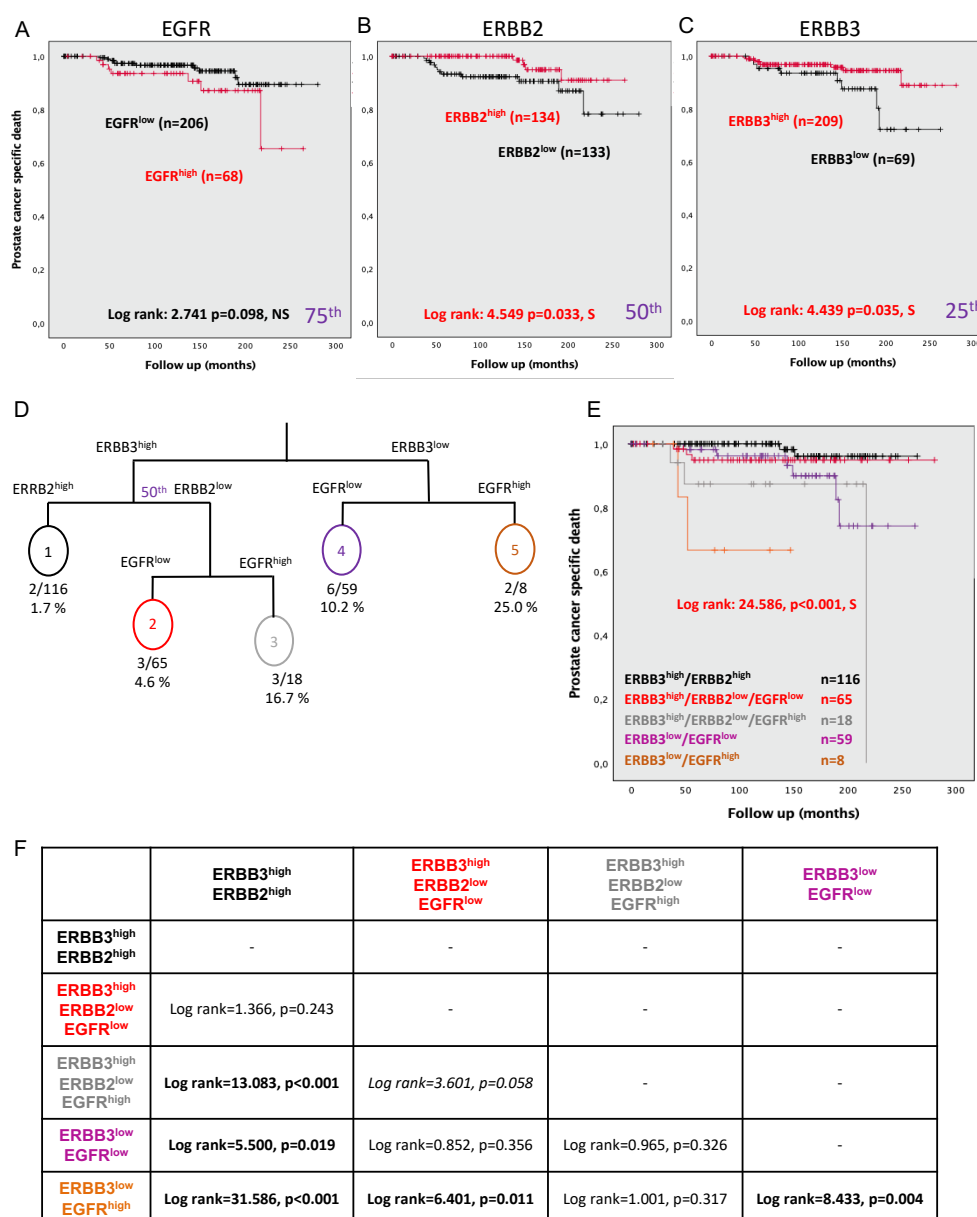


Figure 4. Association of protein expression in epithelial cells of tumor cores with prostate cancer specific death. Kaplan-Meier curves for (A) EGFR with a cutoff at 75th percentiles, (B) ERBB2 with a cutoff using the median and (C) ERBB3 with a cutoff at 25th percentiles. (D) Survival tree including EGFR, ERBB2, ERBB3, and death by PC in an RPART model. (E) Kaplan-Meier plot combines EGFR, ERBB2, and ERBB3 expression. (F) Summary table of log rank between each of the conditions of expression of ERBB members. Significance is indicated by log-rank test. $p < 0.05$ was considered as significant; NS, not significant; S, significant.

Table 5. Univariate Cox regression analyses of ERBBs using prostate cancer-specific mortality as an endpoint.

		Univariate		
		HR [95% CI]		p-value
Age at Dx		0.976	[0.896-1.062]	0.569
PSA at Dx		1.062	[1.009-1.117]	0.021
Gleason score		3.968	[2.395-6.573]	0.001
Margin		1.731	[0.682-4.391]	0.248
pTNM (category)		5.655	[2.928-10.923]	0.001
EGFR_Continuous		1.017	[1.010-1.023]	0.001
EGFR_Dichotomized		2.215	[0.843-5.824]	0.107
ERBB2_Continuous		0.969	[0.933-1.007]	0.107
ERBB2_Dichotomized		0.312	[0.101-0.968]	0.044
ERBB3_Continuous		0.991	[0.985-0.997]	0.002
ERBB3_Dichotomized		0.373	[0.144-0.969]	0.043
Category	Combined all ERBB members	1.865	[1.256-2.768]	0.002
	ERBB3 ^{high} /ERBB2 ^{high}	1.000	-	0.004
	ERBB3 ^{high} /ERBB2 ^{low} /EGFR ^{low}	2.915	[0.487-17.465]	0.241
	ERBB3 ^{high} /ERBB2 ^{low} /EGFR ^{high}	11.755	[1.958-70.566]	0.007
	ERBB3 ^{low} /EGFR ^{low}	5.671	[1.143-28.129]	0.034
	ERBB3 ^{low} /EGFR ^{high}	36.732	[4.901-275.271]	0.001

Abbreviation: Dx=diagnosis, PSA=prostate-specific antigen, cTNM=clinical tumor, lymph nodes, metastasis, pTNM=pathological tumor, lymph nodes, metastasis, HR=hazard ratio, CI=confidence interval.

EGFR_Dichotomized designed high expression (over 75%, EGFR^{high}) and low (under 75%, EGFR^{low}) MFI. ERBB2_Dichotomized designed high expression (over 50% of the median, ERBB2^{high}) and low (under 50% of the median, ERBB2^{low}) MFI. ERBB3_Dichotomized designed high expression (over 25%, ERBB3^{high}) and low (under 25%, ERBB3^{low}) MFI. Significant results (p-value<0.05) are indicated by bold numbers.

3.9 Combining expression levels of EGFR, ERBB2, and ERBB3 can predict PC mortality

The decision tree model (Figure 4-D) revealed five groups with differential risk of PC specific mortality as demonstrated by the Kaplan-Meier analyses (Log rank=24.586 p<0.001) (Figure 4-E). More precisely, the patients presenting ERBB3^{high}/ERBB2^{high} are the group at the least risk of specific PC mortality, and this group was significantly distinct from all other groups except with the ERBB3^{high}/ERBB2^{low}/EGFR^{low}. The group ERBB3^{low}/EGFR^{high} was the group with the highest risk of specific PC mortality, then this group was significantly different from all the other groups except one (ERBB3^{high}/ERBB2^{low}/EGFR^{high}) (Figure 4-F). Cox

regression analysis including the five groups recapitulates the overall Kaplan-Meier analyses (HR=1.865, CI [1.256 – 2.768], $p=0.002$) (Table 5). With a hazard ratio greater than all clinical parameters assessed, three groups (orange, grey and purple) were indicators of patient prognosis. The greatest risk of PC specific mortality was observed for patients expressing ERBB3^{low} coupled with EGFR^{high} (orange: HR=36.732, CI [4.901 – 275.271], $p<0.001$) followed by a combination of EGFR^{high}/ERBB2^{low}/ERBB3^{high} (HR=11.755, CI [1.958 – 70.566], $p=0.007$) and finally by EGFR^{low}/ERBB3^{low} (HR=5.671, CI [1.143 – 28.129], $p=0.034$). Patients with ERBB2^{high} and ERBB3^{high} were those with a better prognosis. These were not significantly different from patients with EGFR^{low}/ERBB2^{low}/ERBB3^{high}.

2.2.2.6 Discussion

In multiple cancers including PC, a personalized therapeutic approach based on individual tumor characteristics has become an ongoing objective for both treating physicians and patients. Since PC is a heterogeneous disease, and that clinical parameters are insufficient to accurately predict disease outcomes, it is important to identify new tools to aid in clinical decisions and patient management.

In this study, we showed that ERBB family members were associated with a greater risk of BCR. These findings are in line with the literature where a high expression of EGFR was associated with PC progression(Koumakpayi *et al.*, 2010; Mandel *et al.*, 2018; Schlomm *et al.*, 2007), and a low ERBB3 expression, located in the nucleus, was associated with a worse prognosis(Koumakpayi *et al.*, 2007) and increased risk of BCR. Also, this study confirms the absence or the very low expression of ERBB4 in PC cell lines and primary cancer tissue(Koumakpayi *et al.*, 2006; Le Page *et al.*, 2005). However, ERBB2 expression in PC progression is more controversial, with one study showing that a high level of ERBB2 is associated with poor prognosis(Minner *et al.*, 2010) as measured by BCR, while a previous study from our group failed to identify any correlation with BCR(Baek *et al.*, 2012). However, in our current study we identified the importance of ERBB2 as a predictor of eventual bone metastases. These results are in line with those reported in breast cancer studies where patients presenting with an ERBB2-positive tumor are more likely to metastasize to the bone when compared to the ERBB2-negative group(Z. Xiong *et al.*, 2018). In addition, several biological studies in pre-clinical prostate models have shown that ERBB2 signaling plays an essential role in the progression from a castration-sensitive to a castration-resistant state associated with

bone metastases (Day *et al.*, 2017; Muniyan *et al.*, 2015). For example, ERBB2 was shown to play a role in the progression of PC through an increase in angiogenesis thereby facilitating the dissemination of tumor cells. ERBB2 also confers an androgen independence state leading to cell survival and proliferation when anti-androgen therapy is used (Muniyan *et al.*, 2015). The contradictory studies looking at ERBB2 expression and the correlation to outcomes in patient tumor tissue could reflect differences in results both in the composition and size of cohorts studied or by differing sources of antibodies used in the studies.

Most studies highlighted a link between a single member of the ERBB family with PC progression using BCR as an endpoint (Baek *et al.*, 2012; Di Lorenzo *et al.*, 2002; Koumakpayi *et al.*, 2010; Minner *et al.*, 2010). When two markers were assessed in the same publication, it was discussed that EGFR was a better predictor of BCR when used alone than combined (Koumakpayi *et al.*, 2010). Another study used a heterogeneous set of specimens from patients treated ($n=29$) or not treated with ADT ($n=29$) to perform their survival analyses in combining EGFR to ERBB2 (Di Lorenzo *et al.*, 2002). They showed that patients presenting EGFR^{high} and ERBB2^{high} were more likely to experience a BCR. In this present study, we combined three out of the four ERBB family members and evaluated their prognostic value against three clinically relevant PC endpoints. We excluded ERBB4 from all analyses in reason of the low expression of this biomarker in prostate cell lines by western blot and the non-specificity of IF staining for ERBB4 in patient samples. We found that the combination of ERBB3^{low} coupled with EGFR^{high} was associated with the worst prognosis across all endpoints (BCR, development of bone metastasis and PC specific survival). We also noted a major role of ERBB2 in the development of bone metastasis and this marker was found to be the first marker used to stratify patients in the decision tree model. The important role of ERBBs in the development of metastases has previously been reported in the literature (Day *et al.*, 2017; Murray *et al.*, 2015; Tome-Garcia *et al.*, 2014). Indeed, in a pre-clinical model using cell line in vivo assays, it was demonstrated that EGFR promotes the survival of PC circulating tumor cells while ERBB2 supports cancer cell growth in bones by promoting the RANK signaling pathway (Day *et al.*, 2017). These results support our findings of the association of the ERBB members with worse prognosis.

Since ERBB receptors are differentially expressed in radical prostatectomy specimens, they should form different combinations of dimers (homo/heterodimer) to activate or inhibit diverse cellular pathways. These different dimerization in addition to the fact that trials did not measure the levels of

ERBB receptors, could explain why previous clinical trials studying ERBB family members failed to demonstrate a predictive effect on patient outcomes (Festuccia *et al.*, 2009; Whang *et al.*, 2013; Ziada *et al.*, 2004). Moreover, it would be interesting to investigate how members of ERBBs affect anti-androgen therapy. Our results also highlight that the different receptor combinations in the primary tumor are associated with very different outcomes much later in the post treatment setting in these patients. These molecular markers may provide early indicators of patients with worse prognosis requiring more intense follow-up strategies and possibly earlier and more aggressive therapeutic strategies.

2.2.2.7 Conclusions

Our results suggest that a different combination of ERBB could be useful to stratify patients following local therapy for PC. We demonstrated that patients presenting with an EGFR^{high} coupled with ERBB3^{low} were at 5-fold increased risk of BCR. Patients expressing ERBB2^{low} had a 14-fold increased risk of developing bone metastasis, and were more than 36 times at higher risk of PC mortality. These biomarkers may become useful in the clinic if they are further validated on larger cohorts.

Author Contributions: Conceptualization, S.C., V.O., B.P., A.-M.M.-M. and F.S.; methodology, S.C., V.O., B.P. and V.B.; software, S.C., V.O. and P.I.K.; validation, S.C., V.O., B.P. and V.B.; formal analysis, S.C. and V.B.; investigation, S.C.; resources, A.-M.M.-M. and F.S.; writing—original draft preparation, S.C., V.O. and B.P.; writing—review and editing, V.B., P.I.K., A.-M.M.-M. and F.S.; visualization, S.C. and V.O.; supervision, V.O., B.P., A.-M.M.-M. and F.S.; funding acquisition, S.C., A.-M.M.-M. and F.S.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: F.S. and A.-M.M.-M. are researchers of the CRCHUM/ICM, which receives support from the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS). This work was supported by the Movember Foundation (Movember GAP1 Tissue Biomarkers project) and a CUOG grant in prostate cancer. Biobanking was done in collaboration with the Réseau de recherche sur le cancer (RRCancer-FRQS) that is affiliated with the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). Tissue microarray construction was supported by the Terry Fox Research Institute. S.C. was supported by the Raymond Garneau Research Chair in Prostate Cancer and received funding from the Institut du cancer de Montréal and the Défi Canderel.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee de la recherche du CHUM on 11 October 2012 (#2013-4072, CE 12.216-BSP).

Informed Consent Statement: All subjects gave their informed consent in the PC biobank of the CHUM, affiliated to the Réseau de la recherche sur le cancer (RRCancer), for inclusion before they participated in the study.

Acknowledgments: We thank the Molecular Pathology core facility of CRCHUM (Liliane Meunier, Gabriela Fragoso) for tissue sectioning, slides scanning, and the use of VisioMorph software. All authors are researchers of the CRCHUM, which receive support from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). This work was supported by the Movember Foundation (Movember GAP1 Tissue Biomarkers project) and a CUOG (Canadian Urologic Oncology Group) award. We are grateful to all patients who agreed to be part of the CRCHUM PC tumor bank and biobank staff for their assistance. Biobanking was done in collaboration with the Réseau de recherche sur le cancer (RRCancer - FRQS) that is affiliated with the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). TMA construction was supported by the Terry Fox Research Institute. SC was supported by the Raymond Garneau Chair in Prostate Cancer Research and received funding from the Institut du cancer de Montréal and the Défi Canderel.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

2.2.2.8 References

1. Quinlan, D.M., A.W. Partin, and P.C. Walsh. Can aggressive prostatic carcinomas be identified and can their natural history be altered by treatment? *Urology* **1995**. 46(3 Suppl A), p. 77-82.
2. Epstein, J.I. An update of the Gleason grading system. *J Urol* **2010**. 183(2), p. 433-40.
3. Hoogland, A.M., C.F. Kweldam, and G.J. van Leenders. Prognostic histopathological and molecular markers on prostate cancer needle-biopsies: a review. *Biomed Res Int* **2014**. 2014, p. 341324.
4. Oldenhuis, C.N., S.F. Oosting, J.A. Gietema, and E.G. de Vries. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer* **2008**. 44(7), p. 946-53.

5. Gannon, P.O., L. Lessard, L.M. Stevens, V. Forest, L.R. Begin, S. Minner, P. Tennstedt, T. Schlomm, A.M. Mes-Masson, and F. Saad. Large-scale independent validation of the nuclear factor-kappa B p65 prognostic biomarker in prostate cancer. *Eur J Cancer* **2013**. 49(10), p. 2441-8.
6. Labouba, I., C. Le Page, L. Communal, T. Kristessen, X. You, B. Peant, V. Barres, P.O. Gannon, A.M. Mes-Masson, and F. Saad. Potential Cross-Talk between Alternative and Classical NF-kappaB Pathways in Prostate Cancer Tissues as Measured by a Multi-Staining Immunofluorescence Co-Localization Assay. *PLoS One* **2015**. 10(7), p. e0131024.
7. Jamaspishvili, T., P.G. Patel, Y. Niu, T. Vidotto, I. Caven, R. Livergant, W. Fu, A. Kawashima, N. How, J.B. Okello, L.B. Guedes, V. Ouellet, C. Picanco, M. Koti, R.B. Reis, F. Saad, A.M. Mes-Masson, T.L. Lotan, J.A. Squire, Y.P. Peng, D.R. Siemens, and D.M. Berman. Risk stratification of prostate cancer through quantitative assessment of PTEN loss (qPTEN). *J Natl Cancer Inst* **2020**.
8. Leclerc, B.G., R. Charlebois, G. Chouinard, B. Allard, S. Pommey, F. Saad, and J. Stagg. CD73 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* **2016**. 22(1), p. 158-66.
9. Clairefond, S., B. Peant, V. Ouellet, V. Barres, Z. Tian, D. Trudel, P.I. Karakiewicz, A.M. Mes-Masson, and F. Saad. PUMA and NOXA Expression in Tumor-Associated Benign Prostatic Epithelial Cells Are Predictive of Prostate Cancer Biochemical Recurrence. *Cancers (Basel)* **2020**. 12(11).
10. Grosset, A.A., V. Ouellet, C. Caron, G. Fragosio, V. Barres, N. Delvoye, M. Latour, A. Aprikian, A. Bergeron, S. Chevalier, L. Fazli, N. Fleshner, M. Gleave, P. Karakiewicz, L. Lacombe, J.B. Lattouf, T. van der Kwast, D. Trudel, A.M. Mes-Masson, F. Saad, and N. Canadian Prostate Cancer Biomarker. Validation of the prognostic value of NF-kappaB p65 in prostate cancer: A retrospective study using a large multi-institutional cohort of the Canadian Prostate Cancer Biomarker Network. *PLoS Med* **2019**. 16(7), p. e1002847.
11. Dankner, M., V. Ouellet, L. Communal, E. Schmitt, D. Perkins, M.G. Annis, V. Barres, C. Caron, A.M. Mes-Masson, F. Saad, P.M. Siegel, and N. Canadian Prostate Cancer Biomarker. CCN3/Nephroblastoma Overexpressed Is a Functional Mediator of Prostate Cancer Bone Metastasis That Is Associated with Poor Patient Prognosis. *Am J Pathol* **2019**. 189(7), p. 1451-1461.

12. Fleischmann, A., C. Rocha, N. Saxer-Sekulic, I. Zlobec, G. Sauter, and G.N. Thalmann. High CD10 expression in lymph node metastases from surgically treated prostate cancer independently predicts early death. *Virchows Arch* **2011**. 458(6), p. 741-8.
13. Dunn, K.L., P.S. Espino, B. Drobic, S. He, and J.R. Davie. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* **2005**. 83(1), p. 1-14.
14. Normanno, N., C. Bianco, A. De Luca, M.R. Maiello, and D.S. Salomon. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* **2003**. 10(1), p. 1-21.
15. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2004**. 4(5), p. 361-70.
16. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* **2003**. 284(1), p. 99-110.
17. Hynes, N.E. and G. MacDonald. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* **2009**. 21(2), p. 177-84.
18. Roskoski, R., Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* **2014**. 79, p. 34-74.
19. Ramieri, M.T., R. Murari, C. Botti, E. Pica, G. Zotti, and P.L. Alo. Detection of HER2 amplification using the SISH technique in breast, colon, prostate, lung and ovarian carcinoma. *Anticancer Res* **2010**. 30(4), p. 1287-92.
20. Huang, Y.C., Yongchang, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Phosphorylation, Signaling and Trafficking in Prostate Cancer. 2011. 10.5772/27021.

21. Lorenzo, G.D., R. Bianco, G. Tortora, and F. Ciardiello. Involvement of growth factor receptors of the epidermal growth factor receptor family in prostate cancer development and progression to androgen independence. *Clin Prostate Cancer* **2003**. 2(1), p. 50-7.

22. Koumakpayi, I.H., C. Le Page, A.M. Mes-Masson, and F. Saad. Hierarchical clustering of immunohistochemical analysis of the activated ErbB/PI3K/Akt/NF-kappaB signalling pathway and prognostic significance in prostate cancer. *Br J Cancer* **2010**. 102(7), p. 1163-73.

23. Di Lorenzo, G., G. Tortora, F.P. D'Armiento, G. De Rosa, S. Staibano, R. Autorino, M. D'Armiento, M. De Laurentiis, S. De Placido, G. Catalano, A.R. Bianco, and F. Ciardiello. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2002**. 8(11), p. 3438-44.

24. Peraldo-Neia, C., G. Migliardi, M. Mello-Grand, F. Montemurro, R. Segir, Y. Pignochino, G. Cavalloni, B. Torchio, L. Mosso, G. Chiorino, and M. Aglietta. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer* **2011**. 11, p. 31.

25. Tambo, M., E. Higashihara, Y. Terado, K. Nutahara, and T. Okegawa. Comparison of serum HER2/neu with immunohistochemical HER2/neu expression for the prediction of biochemical progression in metastatic prostate cancer. *Int J Urol* **2009**. 16(4), p. 369-74.

26. Edwards, J., P. Traynor, A.F. Munro, C.F. Pirret, B. Dunne, and J.M. Bartlett. The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2006**. 12(1), p. 123-30.

27. Koumakpayi, I.H., J.S. Diallo, C. Le Page, L. Lessard, A. Filali-Mouhim, L.R. Begin, A.M. Mes-Masson, and F. Saad. Low nuclear ErbB3 predicts biochemical recurrence in patients with prostate cancer. *BJU Int* **2007**. 100(2), p. 303-9.

28. Hashemi, M., N. Moradi, M. Rezaei, S. Sanaei, S.A. Ziaee, B. Narouie, M. Sotoudeh, G. Bahari, and S. Ghavami. ERBB4 gene polymorphisms and the risk of prostate cancer in a sample of Iranian Population. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **2016**. 62(10), p. 43-8.

29. Robinson, D., F. He, T. Pretlow, and H.J. Kung. A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**. 93(12), p. 5958-62.
30. Appert-Collin, A., P. Hubert, G. Cremel, and A. Bennasroune. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front Pharmacol* **2015**. 6, p. 283.
31. Zietarska, M., J. Madore, J.S. Diallo, N. Delvoye, F. Saad, D. Provencher, and A.M. Mes-Masson. A novel method of cell embedding for tissue microarrays. *Histopathology* **2010**. 57(2), p. 323-9.
32. Schlomm, T., P. Kirstein, L. Iwers, B. Daniel, T. Steuber, J. Walz, F.H. Chun, A. Haese, J. Kollermann, M. Graefen, H. Huland, G. Sauter, R. Simon, and A. Erbersdobler. Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2007**. 13(22 Pt 1), p. 6579-84.
33. Mandel, A., P. Larsson, M. Sarwar, J. Semenas, A.S. Syed Khaja, and J.L. Persson. The interplay between AR, EGF receptor and MMP-9 signaling pathways in invasive prostate cancer. *Mol Med* **2018**. 24(1), p. 34.
34. Koumakpayi, I.H., J.S. Diallo, C. Le Page, L. Lessard, M. Gleave, L.R. Begin, A.M. Mes-Masson, and F. Saad. Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2006**. 12(9), p. 2730-7.
35. Le Page, C., I.H. Koumakpayi, L. Lessard, A.M. Mes-Masson, and F. Saad. EGFR and Her-2 regulate the constitutive activation of NF-kappaB in PC-3 prostate cancer cells. *Prostate* **2005**. 65(2), p. 130-40.
36. Minner, S., B. Jessen, L. Stiedenroth, E. Burandt, J. Kollermann, M. Mirlacher, A. Erbersdobler, C. Eichelberg, M. Fisch, T.H. Brummendorf, C. Bokemeyer, R. Simon, T. Steuber, M. Graefen, H. Huland, G. Sauter, and T. Schlomm. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2010**. 16(5), p. 1553-60.

37. Baek, K.H., M.E. Hong, Y.Y. Jung, C.H. Lee, T.J. Lee, E.S. Park, M.K. Kim, J.H. Yoo, and S.W. Lee. Correlation of AR, EGFR, and HER2 Expression Levels in Prostate Cancer: Immunohistochemical Analysis and Chromogenic In Situ Hybridization. *Cancer Res Treat* **2012**. 44(1), p. 50-6.

38. Xiong, Z., G. Deng, X. Huang, X. Li, X. Xie, J. Wang, Z. Shuang, and X. Wang. Bone metastasis pattern in initial metastatic breast cancer: a population-based study. *Cancer Manag Res* **2018**. 10, p. 287-295.

39. Muniyan, S., S.J. Chen, F.F. Lin, Z. Wang, P.P. Mehta, S.K. Batra, and M.F. Lin. ErbB-2 signaling plays a critical role in regulating androgen-sensitive and castration-resistant androgen receptor-positive prostate cancer cells. *Cell Signal* **2015**. 27(11), p. 2261-71.

40. Day, K.C., G. Lorenzatti Hiles, M. Kozminsky, S.J. Dawsey, A. Paul, L.J. Broses, R. Shah, L.P. Kunja, C. Hall, N. Palanisamy, S. Daignault-Newton, L. El-Sawy, S.J. Wilson, A. Chou, K.W. Ignatoski, E. Keller, D. Thomas, S. Nagrath, T. Morgan, and M.L. Day. HER2 and EGFR Overexpression Support Metastatic Progression of Prostate Cancer to Bone. *Cancer Res* **2017**. 77(1), p. 74-85.

41. Murray, N.P., E. Reyes, C. Fuentealba, O. Jacob, and N. Orellana. Possible Role of HER-2 in the Progression of Prostate Cancer from Primary Tumor to Androgen Independence. *Asian Pac J Cancer Prev* **2015**. 16(15), p. 6615-9.

42. Tome-Garcia, J., D. Li, S. Ghazaryan, L. Shu, and L. Wu. ERBB2 increases metastatic potentials specifically in androgen-insensitive prostate cancer cells. *PLoS One* **2014**. 9(6), p. e99525.

43. Ziada, A., A. Barqawi, L.M. Glode, M. Varella-Garcia, F. Crighton, S. Majeski, M. Rosenblum, M. Kane, L. Chen, and E.D. Crawford. The use of trastuzumab in the treatment of hormone refractory prostate cancer; phase II trial. *Prostate* **2004**. 60(4), p. 332-7.

44. Festuccia, C., G.L. Gravina, L. Biordi, S. D'Ascenzo, V. Dolo, C. Ficorella, E. Ricevuto, and V. Tombolini. Effects of EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib in prostate cancer cells in vitro. *Prostate* **2009**. 69(14), p. 1529-37.

45. Whang, Y.E., A.J. Armstrong, W.K. Rathmell, P.A. Godley, W.Y. Kim, R.S. Pruthi, E.M. Wallen, J.M. Crane, D.T. Moore, G. Grigson, K. Morris, C.P. Watkins, and D.J. George. A phase II study of lapatinib, a dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor, in patients with castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol* **2013**. 31(1), p. 82-6.

2.2.2.9 Supplementary materials

The following are available online at www.mdpi.com/xxx, Figure S1: Evaluation of antibody specific for all ERBB family members. Figure S2. Whole Western blots of ERBB expression in PC cell lines.

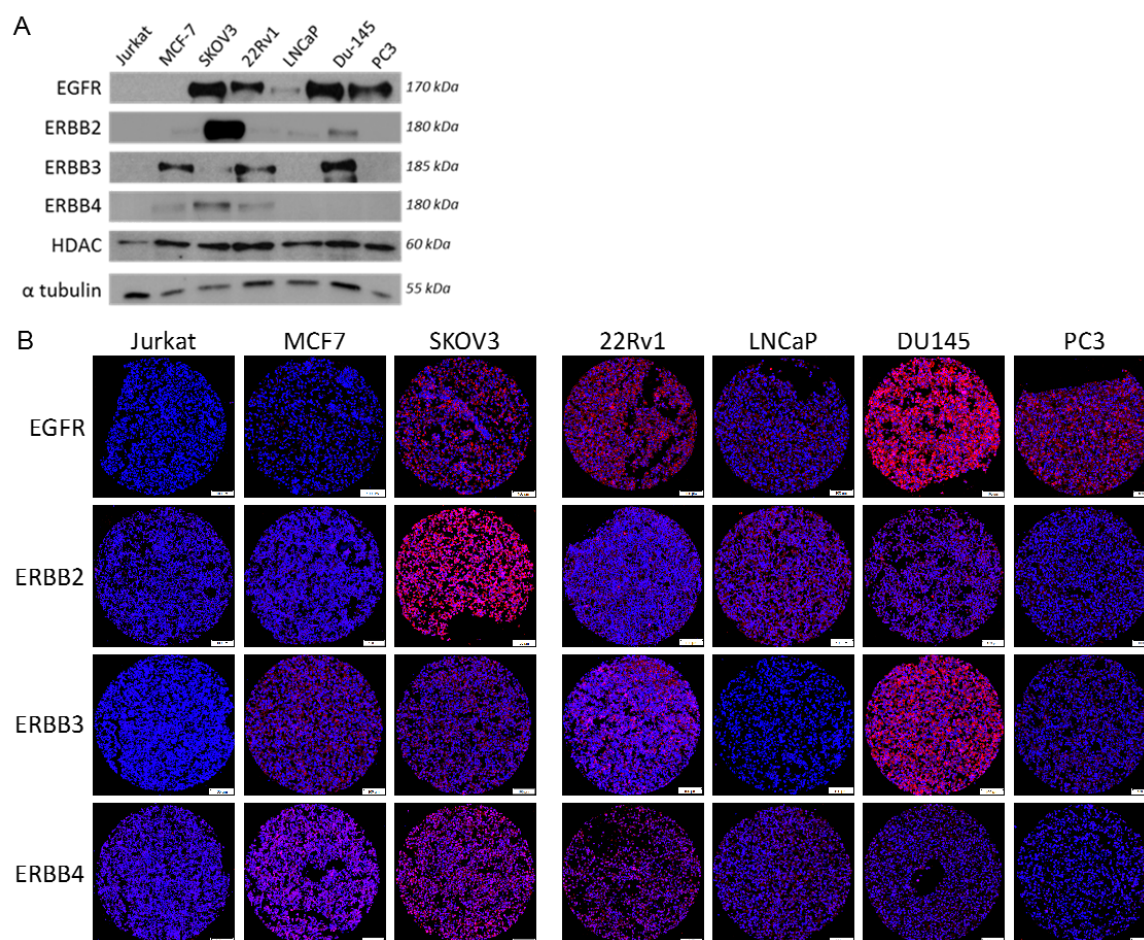
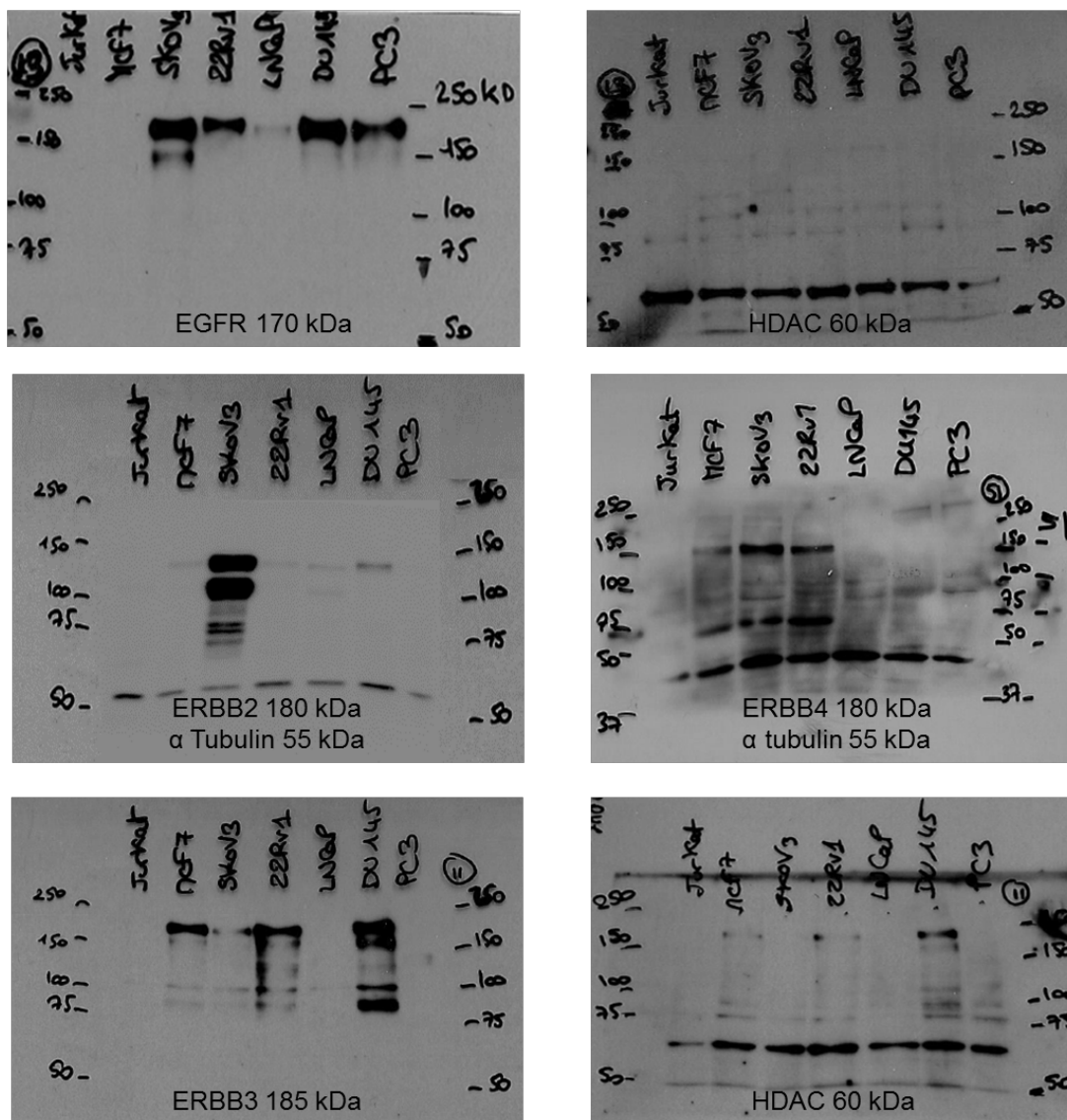


Figure S1. Evaluation of antibody specificity for all ERBB family members. (A) Expression of EGFR, ERBB2, ERBB3, and ERBB4 evaluated by western blot in different cell lines. α -tubulin or HDAC served as a

loading control for Western blots. (B) Representative staining for each protein in different paraffin-embedded cell lines. DAPI (blue) and protein of interest (red). The scale bar at 100 μ m is for the whole image.

A



B

	Jurkat	MCF-7	SKOV3	22Rv1	LNCaP	DU145	PC3
EGFR	0.34	0.27	1.63	0.83	0.61	1.79	1.40
ERBB2	0.41	0.95	1.67	0.78	0.62	0.88	0.15
ERBB3	0.32	0.94	0.83	1.24	0.54	1.50	0.36
ERBB4	0.27	0.72	0.82	0.80	0.35	0.43	0.38

Figure S2. Whole Western blots of ERBB expression in PC cell lines. (A) Detection of EGFR, ERBB2, ERBB3 and ERBB4 in whole cell lysates in PC cell lines, with α -Tubulin or HDAC as a control. (B) Intensity ratio of biomarkers for each cell line, normalized with α -Tubulin or HDAC.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3 DISCUSSION

Ce projet de recherche a mené à la validation de biomarqueurs prometteurs sur une plus large cohorte que celle qui avait été testée dans le passé, et a également permis de faire l'intégration de la technique d'immunofluorescence afin de faire l'analyse de plusieurs biomarqueurs simultanément. Plus spécifiquement, il a fallu faire la validation des multi-marquages par immunofluorescence pour l'étude de la combinaison des biomarqueurs et de leur expression, seul et en combinaison, dans différents compartiments tissulaires.

La validation des biomarqueurs étudiés dans ce projet de recherche a été obtenue suite à l'optimisation de multi-marquages en immunofluorescence dans les TMA ainsi qu'à une quantification précise de l'expression des marqueurs par analyse digitale. La pertinence de ces techniques par rapport aux techniques standards va être discutée. Puis, ce projet de recherche a montré que les protéines PUMA, NOXA, EGFR, ERBB2 et ERBB3 représentent des biomarqueurs très prometteurs pour mieux stratifier les patients atteints d'un cancer de la prostate en fonction de leur pronostique. L'intérêt de ces marqueurs en clinique et la pertinence des résultats obtenus pour ces protéines vont être détaillés en discussion.

3.1 Approche des techniques d'immunohistochimie et d'immunofluorescence

L'immunohistochimie et l'immunofluorescence sont deux techniques d'immuno-marquage qui sont utilisées pour permettre de localiser des antigènes dans un tissu ou une cellule par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques. Les avantages d'utiliser l'une ou l'autre technique dépendent de plusieurs facteurs qui vont être discutés ici.

Ces deux techniques peuvent être réalisées de façon directe ou de façon indirecte (Aoki *et al.*, 2010). Dans le cas de l'immuno-marquage direct, il y a utilisation d'un seul anticorps conjugué ciblant l'antigène de la molécule d'intérêt. Tandis qu'avec l'immuno-marquage indirect, il y a nécessité d'utiliser plusieurs anticorps successivement. D'abord, l'anticorps primaire non conjugué qui cible un antigène spécifique de la molécule d'intérêt. Ensuite, l'anticorps secondaire conjugué qui va reconnaître l'antigène de l'anticorps primaire (Figure 17).

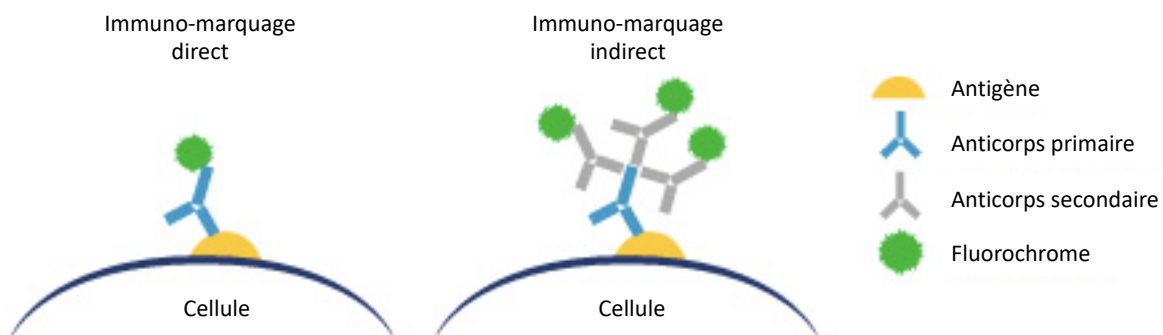


Figure 17: Représentation de l'immuno-marquage direct et de l'immuno-marquage indirect.
Provenant et traduit depuis le site web www.abcam.com

3.1.1 Technique d'immunohistochimie (IHC)

Les anticorps utilisés dans le cas de l'IHC sont conjugués à une enzyme qui va réagir avec son chromogène pour donner un précipité. Les principales enzymes de révélation utilisées sont la HRP (de l'anglais *horseradich peroxidase*) et l'AP (de l'anglais *alkaline phosphatase*). La disponibilité des chromogènes est en plein développement, voici ceux le plus couramment utilisés : la 3,3'-diaminobenzidine (DAB, coloration marron), la 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, coloration rouge) et le nitro blue tetrazolium (NBT, coloration bleu foncé) (Stack *et al.*, 2014). L'observation de ce précipité est réalisée avec un microscope à champ clair (Stack *et al.*, 2014). Le marquage par IHC peut être effectué sur des cellules (cytologie), des coupes de tissus congelés et/ou en paraffine. De façon générale et afin d'avoir une meilleure reproductibilité des résultats, il est nécessaire d'avoir des contrôles positifs (échantillons exprimant un haut niveau de la protéine d'intérêt) et des contrôles négatifs (échantillons n'exprimant pas la protéine d'intérêt). Ces contrôles sont aussi importants pour identifier une différence d'intensité de signal entre plusieurs lames à analyser. Cette technique présente l'avantage d'être accessible en routine dans les laboratoires d'analyses médicales et de permettre, pour les pathologistes, une quantification rapide de l'expression d'une protéine évaluable à l'œil nu. Cette quantification est généralement faite sous forme de score d'expression allant de 0, pour une absence d'expression, à 3 pour une forte expression. Cependant, il peut aussi s'agir d'un pourcentage de cellules marquées positivement ou alors le compartiment marqué (noyaux versus cytoplasme) combinés à l'intensité du marquage. Elle est, de plus, facile à mettre en place et peu coûteuse puisqu'elle ne nécessite pas l'utilisation de microscope développé et de logiciels spécifiques. De plus, les lames d'IHC peuvent être conservées pendant des années et révisées ultérieurement.

Malgré ces avantages et son emploi intensif en clinique, l'IHC présente certaines limites. Étant donné que cette technique repose sur des réactions enzymatiques, son utilisation est souvent limitée à un seul marquage de protéines par lame d'échantillon. Pour certaines études, il est donc nécessaire de faire des marquages successifs sur des lames consécutives mais comme le cancer de la prostate est hétérogène, il peut y avoir une rapide évolution du tissu qui réduit la possibilité de comparaison entre les lames d'échantillon issues de coupes successives. Toutefois, l'IHC a tendance à évoluer de plus en plus vers des marquages en multiplexe avec l'utilisation de plusieurs anticorps conjugués à différentes enzymes, poussant la limite de détection à 5 ou 6 biomarqueurs par lame (Glass *et al.*, 2009) (Stack *et al.*, 2014) (Kroeger *et al.*, 2016). Cette utilisation en multiplexe induit néanmoins une importante perte d'immunogénicité de l'échantillon et donc une forte diminution de la qualité du marquage (Glass *et al.*, 2009) (Stack *et al.*, 2014). Et ce d'autant plus que le multi-marquage par IHC conduit à des résultats peu satisfaisants pour l'analyse de la co-distribution et de la co-localisation de deux protéines dans un compartiment cellulaire (van der Loos *et al.*, 2013) (Lo *et al.*, 2016). Afin d'atténuer cette problématique, il est possible de faire du multi-marquage en séquence à partir d'un même échantillon tissulaire. Après chaque IHC sur une protéine d'intérêt, les coupes d'échantillons sont numérisées et réutilisées pour procéder à d'autres IHC après élution du précédent anticorps (Glass *et al.*, 2009). À l'aide d'un logiciel d'imagerie, il est alors possible de faire une superposition des images des échantillons et d'obtenir la co-distribution de différentes protéines.

L'IHC présente également un certain biais sur le plan de la quantification du marquage et donc de la précision des résultats, car l'analyse est faite par une personne ce qui est une source de subjectivité et d'erreurs. De plus, la quantification d'un marquage par IHC est généralement exprimée sous la forme d'un score d'expression relatif, ce qui apporte moins de précision et plus de limites que l'obtention de valeurs continues par la quantification d'un marquage IF. Il est à noter que le développement actuel des logiciels d'analyse d'images vise à obtenir une quantification des marquages IHC sous forme de valeurs continues.

3.1.2 Technique d'immunofluorescence (IF)

Le premier marquage par IF a eu lieu dans les années 1940 (Coons *et al.*, 1950) (Coons, 1961). L'IF repose sur les principes de la fluorescence c'est-à-dire la réponse à une absorption de lumière. Elle est caractérisée par l'émission de photons par une molécule lors du passage d'un état d'excitation (énergie d'émission) vers un état fondamental (énergie d'absorption). La fluorescence peut être générée naturellement dans des coupes de tissu (il s'agit alors d'auto-fluorescence) comme, par exemple, les

globules rouges et le collagène qui ont des propriétés fluorescentes (Baschong *et al.*, 2001). La fluorescence peut être induite par l'ajout d'une substance chimique appelé fluorochrome (ou fluorophore) qui émettra un signal à une longueur d'onde connue après excitation à une longueur d'onde donnée spécifique (Donaldson, 2001). Les principaux fluorochromes utilisés en IF sont : le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) qui fluoresce dans la partie bleue du spectre lumineux et marque spécifiquement le noyau des cellules, le FITC (fluorescein isothiocyanate, dérivé de la fluorescéine) qui fluoresce dans la partie verte du spectre lumineux, le TRITC (tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate dérivé de la Rhodamine) qui fluoresce dans la partie orange du spectre lumineux et Cyanine 5 (Cy5) qui fluoresce dans la partie rouge du spectre lumineux (Figure 18) (Waggoner, 2006).

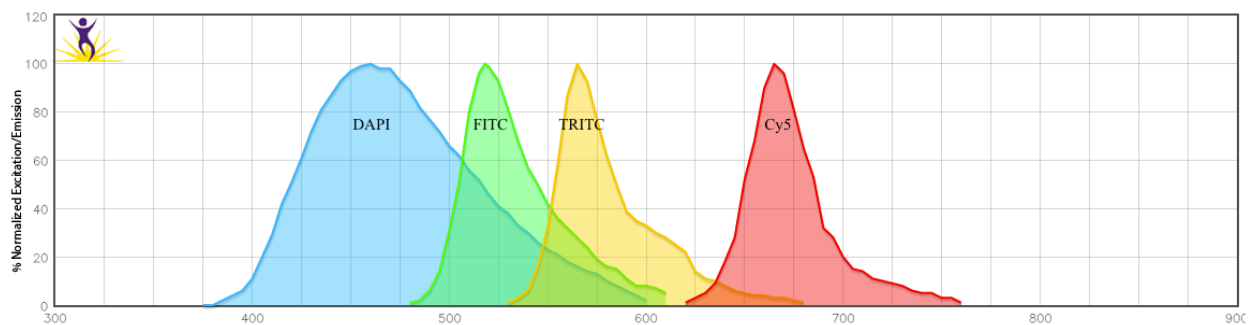


Figure 18: Spectre de fluorescence des principaux fluorochromes utilisés en IF.

Crée à partir du site web www.biolegend.com

Le fluorochrome doit permettre l'obtention d'un signal spécifique, durable et fort (Waggoner, 2006). Cette technique est réalisable sur des échantillons en suspension, sur des cultures en monocouche et sur des coupes tissulaires. Depuis le début de l'utilisation de l'IF, son amélioration et le développement d'un grand nombre d'anticorps et de fluorochromes ont permis d'en faire une technique utilisable en routine (Donaldson, 2001). Actuellement, elle est grandement utilisée pour le diagnostic (en bactériologie et en virologie) et la recherche fondamentale dans diverses études en biologie (suivi du cycle cellulaire et tri cellulaire par cytométrie de flux, localisation cellulaire et hybridation moléculaire). De plus, l'IF permet de visualiser et/ou de quantifier de façon précise des molécules d'intérêts dans des échantillons biologiques. L'IF a longtemps été utilisée pour des analyses qualitatives, permettant d'une part de déterminer la présence d'une protéine dans un échantillon mais aussi sa localisation dans un tissu ou une cellule, ainsi que sa co-localisation avec d'autres protéines marquées simultanément. Il est à noter que malgré un protocole plus rapide, l'IF directe reste moins couramment utilisée que l'IF indirecte en raison de son marquage moins sensible. En effet, l'IF directe implique qu'un seul anticorps couplé à un fluorochrome qui va reconnaître une seule protéine, tandis que l'IF indirecte implique que plusieurs anticorps

secondaires couplés à des fluorochromes vont pouvoir se fixer à un même anticorps primaire. De plus, bien qu'en plein développement, le choix d'anticorps primaires conjugués à des fluorochromes reste assez limité. L'IF directe semble avoir un plus grand potentiel pour le multi-marquage car cette technique s'affranchit des potentielles hybridations non spécifiques des anticorps secondaires lorsque le nombre d'épitopes est faible ce qui peut conduire à un chevauchement des signaux entre les différentes moléculaires marquées. L'observation du marquage par IF est réalisée avec un microscope à épi fluorescence ou avec un microscope confocal (Waggoner, 2006). L'IF est donc une technique de choix pour le suivi de l'expression de protéines en tissu.

Le plus gros avantage de l'IF est de pouvoir faire le marquage spécifique d'une ou plusieurs protéines et de visualiser leur localisation dans le tissu ou dans la cellule (Mori *et al.*, 2016). De ce fait, une seule coupe de tissu peut permettre le marquage et le suivi de l'expression de plusieurs protéines simultanément, en tenant compte des spectres des fluorochromes. Ce multi-marquage permet d'avoir une réponse satisfaisante concernant la co-localisation et la co-expression des protéines (T. Suzuki *et al.*, 2005) (Robertson *et al.*, 2008) (Yarilin *et al.*, 2015). Par exemple, la littérature rapporte des marquages de compartiments cellulaires et tissulaires tels que le noyau, l'épithélium et le stroma pour identifier l'expression de diverses protéines dans le cancer de la prostate (Labouba *et al.*, 2015) (Dankner *et al.*, 2019) (Grosset *et al.*, 2019). Une étude a rapporté le marquage d'organites tels que le nucléole, l'appareil de Golgi et les vésicules, pour obtenir la localisation subcellulaire de six protéines jouant un rôle important dans l'instabilité des microsatellites dans le cancer colorectal (Kovacheva *et al.*, 2016). Il s'agit de quelques exemples parmi les multiples publications ayant eu recours à cette technique. À ce titre, l'utilisation de la microscopie confocale est un atout majeur pour déterminer avec une grande précision la localisation d'une ou plusieurs protéines en raison de la haute résolution des images et d'un grossissement élevé disponible sur ce type de microscopie (section de l'échantillon en tranche optique). Depuis quelques années, l'IF est également devenue une méthode d'analyse quantitative reconnue puisque le signal lié au marquage des protéines peut être acquis par spectroscopie et quantifié de façon automatique ou semi-automatique via des logiciels d'analyse d'images. L'automatisation de la détection et de la quantification des signaux fluorescents permet l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons avec une plus grande précision ce qui conduit à l'obtention de résultats plus objectifs et fiables. L'IF est une technique assez rapide et facile d'utilisation ce qui la rend accessible dans la plupart des laboratoires de recherche fondamentale.

Néanmoins, l'IF présente quelques limites. En premier lieu, la préparation des coupes tissulaires doit suivre des paramètres précis de fixation et de perméabilisation, semblables à ceux utilisés en IHC en pathologie, pour obtenir une bonne conservation de l'intégrité des antigènes des protéines (Donaldson, 2015). En second lieu, lors du suivi de l'expression de plusieurs protéines avec des anticorps primaires générés chez une même espèce, il est impératif d'ajouter plusieurs étapes successives au protocole de marquage. Effectivement entre le marquage de chaque protéine d'intérêt il est nécessaire d'ajouter une étape de blocage afin de s'assurer que l'anticorps secondaire a bien saturé la totalité des sites de l'anticorps primaire précédent. Un blocage insuffisant peut entraîner une diminution de la spécificité des marquages en lien avec la fixation d'un anticorps secondaire au mauvais anticorps primaire. Le nombre de protéines différentes identifiables par multi-marquage est limité par les chevauchements des spectres spécifiques aux fluorochromes utilisés ainsi que par l'encombrement stérique des molécules. Il faut en outre s'assurer d'avoir des contrôles d'expression afin de s'affranchir de résultats provenant d'un faux positif ou d'un faux négatif. Il peut s'agir d'ajouter des cellules ou des tissus qui ont un niveau d'expression connue pour la protéine d'intérêt. L'idéal est l'utilisation d'un contrôle négatif (aucune expression de la protéine) et d'un contrôle positif (expression élevée de la protéine). Dans le cas de l'IF indirecte, il est également judicieux d'avoir une coupe de tissu sur laquelle seul l'anticorps secondaire est appliqué afin de s'affranchir du bruit de fond liée à la spécificité de cet anticorps secondaire mais aussi de l'auto-fluorescence naturellement produite par certains tissus et certaines molécules telles que le collagène. Ce bruit de fond est ensuite soustrait lors de l'analyse des échantillons d'intérêt si nécessaire. Il est à noter que l'ajout de réactif tel que le Sudan Black B permet de réduire cette auto-fluorescence (Y. Sun *et al.*, 2011). Par ailleurs, il est important de savoir que l'IF ne permet pas l'émission d'un signal permanent (Mori *et al.*, 2016). Cette limitation est liée aux propriétés du fluorochrome (durée d'émission) et à son environnement (méthode de conservation ou exposition à une source lumineuse). Elle peut créer un biais lors de l'analyse de l'expression de la protéine et lors de l'interprétation des résultats obtenus. Cette observation est particulièrement importante lors de comparaison de plusieurs lames de tissus. Pour obtenir des résultats quantitatifs, il est alors nécessaire d'effectuer une normalisation du signal fluorescent obtenu à l'aide des différents contrôles positifs et négatifs et en fonction des différentes lames marquées par IF (voir 3.2.3). Afin de palier à cette diminution du signal, il est nécessaire de faire un scan des lames pour obtenir des images qui seront analysables ultérieurement. Cependant, le stockage de ces images est volumineux et actuellement l'espace de stockage disponible nécessite que des nettoyages d'images soient réalisés afin d'éviter des maintenances de longues périodes entraînant des coûts prohibitifs. De plus, en termes d'équipements, l'IF nécessite du matériel de microscopie ainsi que des

logiciels d'analyse d'images qui restent relativement onéreux. À cela, il faut ajouter le besoin d'une formation technique spécifique pour les utilisateurs de ces types de logiciel. Actuellement, ces surcharges de coûts ne permettent pas une utilisation en routine dans les départements cliniques de pathologie.

À la vue de ces connaissances, on comprend que les départements cliniques de pathologie n'ont pas encore adoptés l'IF même s'ils utilisent de plus en plus de techniques basées sur la fluorescence telle que l'hybridation *in situ* en fluorescence. Actuellement, l'IF est grandement utilisée en recherche en lien avec sa grande précision alors qu'en clinique c'est l'IHC qui est utilisée. La prépondérance de l'IHC en clinique s'explique par rapport à la rapidité de l'obtention des résultats nécessaires pour un diagnostic de maladie. Cependant, dans ce projet de recherche, les biomarqueurs identifiés seraient utilisés pour prédire le devenir des patients. De ce fait, les analyses d'IF n'ont pas besoin d'être réalisées en urgence et elles pourraient être exécutées par un autre service que les départements cliniques de pathologie.

3.2 Optimisation de la technique d'immunofluorescence

Afin de permettre une meilleure évaluation de l'immunofluorescence pour ce projet de recherche, une optimisation de cette technique a été indispensable. Elle a été faite en trois temps : 1) mise au point des conditions d'utilisation de chaque anticorps ciblant les protéines d'intérêt; 2) optimisation du multi-marquage (cellules basales et épithéliales); 3) perfectionnement de l'utilisation du logiciel d'analyse d'images.

3.2.1 Choix et spécificité des anticorps pour les protéines d'intérêts

Dans un premier temps, les anticorps ciblant les protéines d'intérêts ont été sélectionnés en se basant sur les précédentes études effectuées au laboratoire. Cependant, entre les travaux réalisés en 2006-2007 (Diallo *et al.*, 2007) ou 2009-2010 (Koumakpayi *et al.*, 2010) et le début de ce projet de recherche en 2015, nous avons été confrontés au problème de disponibilité des anciens anticorps, la plupart de ceux-ci (anti-PUMA, -EGFR, -ERBB2 et -ERBB3) n'étant plus en vente. Il a donc été nécessaire de faire une nouvelle sélection pour ces anticorps. En ce qui concerne l'anticorps anti-NOXA, il était encore disponible commercialement et pour l'anti-ERBB4, il s'agissait d'une première étude donc la sélection de l'anticorps restait encore à faire.

Dans l'optique d'une utilisation possible en clinique, nous avons favorisé les anticorps monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont un mélange de molécules d'immunoglobuline sécrétées contre un antigène particulier tandis que les anticorps monoclonaux sont produits par un seul clone de plasmocytes B. De ce fait, les anticorps monoclonaux ont une production de population hautement homogène d'anticorps assurant une meilleure reproductibilité de lot à lot. Nonobstant l'indisponibilité des anticorps anti-PUMA, -EGFR, -ERBB2 et -ERBB3 utilisés dans nos précédentes études, il est à noter qu'ils étaient tous de type polyclonal et donc une nouvelle sélection s'avérerait d'autant plus nécessaire. Pour NOXA, l'anticorps précédemment utilisé était de type monoclonal donc en adéquation avec nos critères. À cette étape du processus de sélection, nos choix suivants ont été guidés par les résultats rapportés dans la littérature et obtenus avec des anticorps monoclonaux. Les anticorps choisis ont été testés premièrement par immunobuvardage de type western blot (protéines cibles dénaturées) et deuxièmement par immunofluorescence (protéines cibles avec leurs structures tertiaire et quaternaire). Lors des tests de validation avec ces deux techniques, nous avons choisi d'inclure des échantillons provenant de quatre lignées cellulaires prostatiques (22Rv1, LNCaP, DU145 et PC3) ainsi que de lignées cellulaires (Jurkat provenant des lymphocytes T CD4, MCF7 provenant du cancer du sein et SKOV3 provenant du cancer de l'ovaire) exprimant fortement (contrôles positifs) ou n'exprimant pas (contrôles négatifs) les protéines d'intérêts en nous basant sur la littérature. Afin de limiter un possible biais, les analyses ont été faites sur une même culture de cellules divisée en deux au début de l'expérience. Une partie a permis de faire l'immunobuvardage de type western blot et l'autre a été mise en culot de paraffine pour l'immunofluorescence. En regard avec la littérature, nous avons déterminé un classement des lignées cellulaires en fonction de leurs intensités d'expression. L'immunobuvardage de type western blot nous a permis d'avoir une confirmation des niveaux d'expression pour chacune des protéines d'intérêts dans chaque lignée cellulaire. Une fois les anticorps optimisés en ayant obtenu des niveaux similaires à la littérature, ces anticorps ont été testés sur les culots cellulaires par immunofluorescence. Avec cette technique, nous avons voulu confirmer les résultats obtenus par immunobuvardage de type western blot mais aussi valider la bonne localisation des protéines d'intérêts.

La validation de la spécificité des anticorps est nécessaire afin de s'assurer du bon ciblage de nos anticorps (Bordeaux *et al.*, 2010). Parmi les problèmes courants identifiés, il y a le manque de spécificité de la cible (Michel *et al.*, 2009) et la non reproductibilité des anticorps entre les différents lots commerciaux (Grimsey *et al.*, 2008). Dans notre cas, l'optimisation des conditions expérimentales et la validation de la spécificité des anticorps anti-PUMA, -EGFR, -ERBB2 et -ERBB3 ont été assez rapides car un seul anticorps a été testé. La comparaison des résultats obtenus avec les techniques d'immunobuvardage

de type western blot et d'immunofluorescence a montré des niveaux relatifs d'expressions similaires. Par conséquent, l'IF n'a nécessité que quelques ajustements mineurs en termes de concentrations d'anticorps pour obtenir des conditions expérimentales optimales. Pour ce qui est du suivi de l'expression des protéines NOXA et ERBB4, les optimisations furent plus compliquées et nécessitèrent de tester plusieurs anticorps. Pour NOXA, nous avons ainsi essayé des anticorps pour lesquels la localisation du marquage en IF était non reportée dans la littérature. Afin d'avoir une validation de l'anticorps NOXA, nous avons eu recours à l'utilisation de siRNA anti-NOXA avec les différents anticorps. Le choix de l'anticorps anti-NOXA s'est porté sur celui qui a présenté la plus importante diminution du niveau d'expression de la protéine NOXA par immunobuvardage de type western blot et immunofluorescence. Pour ERBB4, nous avons eu plusieurs anticorps qui ont donné des résultats incohérents et non corrélés entre les techniques d'immunobuvardage de type western blot et d'immunofluorescence. Finalement, un clone d'anticorps de ERBB4 a permis d'avoir des résultats conformes à la littérature dans les contrôles positifs et négatifs, mais avec de faibles niveaux d'expression dans les lignées prostatiques.

3.2.2 Optimisation du multi-marquages

Pour obtenir une bonne localisation des protéines d'intérêts dans les échantillons de tissus des patients, il est nécessaire d'avoir recours à du multi-marquage incluant un marquage qui permettra de faire la distinction entre les cellules épithéliales et les cellules basales.

3.2.2.1 Harmonisation du marquage des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales sont importantes car elles sont les cellules sécrétoires et se sont ces cellules qui peuvent acquérir des mutations génétiques les transformant en cellules cancéreuses (S. O. Lee *et al.*, 2012). Le marquage des cellules épithéliales se fait en combinant plusieurs anticorps primaires reconnus par le même anticorps secondaire. Le choix des anticorps primaires constituant ce cocktail dépend de l'espèce de l'anticorps primaire utilisé pour la protéine d'intérêt. Lors de l'utilisation d'un anticorps primaire de type lapin pour la protéine d'intérêt, un cocktail d'anticorps de type souris sera privilégié pour la détection des cellules épithéliales et inversement dans le cas contraire. Ainsi un cocktail d'anticorps anti-cytokératines (CK) 18, anti-CK19 et anti-APS a été sélectionné lorsqu'un anticorps de type lapin a été utilisé contre la protéine d'intérêt (EGFR, ERBB3 et PUMA), et un cocktail d'anticorps anti-CK8 et anti-CK18 lorsqu'un anticorps de type souris a été choisi (ERBB2, ERBB4 et NOXA). Cette sélection différente

d'anticorps pour constituer les cocktails de marquage des cellules épithéliales est liée à la disponibilité commerciale des différents anticorps.

Le niveau d'expression de la cytokératine 8 augmente dans les cellules épithéliales d'un épithélium différencié (Kuchma *et al.*, 2012). La cytokératine 18 est exprimée par des cellules épithéliales constituant un épithélium non différencié (Long *et al.*, 2005). La cytokératine 19 est exprimée chez toutes les cellules épithéliales, quel que soit le degré d'évolution et de différenciation du cancer (Nagle *et al.*, 1991). L'anticorps anti-APS identifie spécifiquement les cellules épithéliales prostatiques d'un épithélium différencié (Long *et al.*, 2005). La combinaison de ces cytokératines permet une détection optimale des cellules épithéliales à tous les niveaux de progression du cancer de la prostate. Par conséquent, ces deux cocktails d'anticorps primaires (anti-CK8, -CK18 et anti-CK18, -CK19, -APS) permettent une très bonne détection de toutes les cellules épithéliales du cancer de la prostate, même dans leur état le plus indifférencié. Néanmoins, dans le cadre d'une utilisation en clinique et afin d'avoir une meilleure harmonisation pour la détection des cellules épithéliales, il me semblait primordial d'avoir un cocktail commun, entre type souris et lapin. En prenant en compte les différents niveaux d'expression des cytokératines par rapport à la progression des cellules épithéliales et la disponibilité de ces anticorps, j'ai utilisé le cocktail de cytokératines 8 et 18. Ces cytokératines ont montré leur potentiel de détection par le passé, aussi bien individuellement qu'ensemble (Wolff *et al.*, 1998). De plus, il existe un cocktail commercialisé et validé pour les cytokératines 8 + 18 de type lapin ce qui permet de réduire les contaminations potentielles dues aux étapes de préparation. Malheureusement, ce cocktail n'existe pas pour le type souris, mais chacune de ces deux cytokératines sont commercialisées séparément. Grâce à l'obtention d'un cocktail maison du sous type souris et l'utilisation du cocktail prêt à être utilisé pour les cytokératines 8 + 18, cela permet d'avoir une harmonisation dans la procédure de détection des cellules épithéliales. De plus, l'utilisation combinée des cytokératines 8 et 18, de type lapin et souris, comme masque épithélial a permis de garantir la sensibilité et la spécificité requises pour détecter les cellules épithéliales prostatiques quel que soit le niveau de différenciation du tissu lors des analyses.

3.2.2.2 Ajout d'un marquage pour les cellules basales

Étant donnée les avantages que l'IF propose en termes de multi-marquage, il est possible de faire l'ajout d'un cocktail d'anticorps permettant la détection du tissu épithélial bénin *via* le marquage des cellules basales. Comme les lames de micro-étalages de tissus comprennent à la fois des échantillons bénins et tumoraux, il est nécessaire, avant analyse des résultats, d'avoir la confirmation que chaque

glande correspond bien à la nature supposée du tissu présent. Sans cette confirmation, il peut exister un biais lié à la mauvaise classification des résultats d'expressions de certaines carottes (bénin vs tumeur). Étant donné que le processus d'analyse d'IF se fait de façon semi-quantitative alors il est nécessaire d'avoir une totale optimisation pour l'identification du type de glande présente, contrairement à l'IHC où c'est le pathologiste qui fait la distinction entre les glandes avec une approche visuelle en fonction de la structure morphologique des glandes. L'ajout du marquage des cellules basales permet donc la distinction entre les glandes bénignes et les glandes tumorales. En effet, il a été montré que le développement d'un cancer de la prostate est caractérisé par la perte des cellules basales des glandes prostatiques (Stoyanova *et al.*, 2013). Afin de faire le marquage de ce type de cellule, nous avons fait le choix d'un cocktail d'anticorps contre des cytokératines de hauts poids moléculaires et contre p63, cocktail couramment utilisé en clinique (X. J. Yang *et al.*, 1999) (Parsons *et al.*, 2001) (Kurita *et al.*, 2004). De ce fait, avec l'identification de la présence des glandes bénignes alors il est possible de faire l'exclusion des glandes tumorales dans les carottes histologiquement identifiées comme bénigne et inversement. De plus, il est à noter que l'ensemble des études d'IHC effectuées à ce jour n'ont été faites qu'en prenant en compte les cellules épithéliales des tissus tumoraux. L'ajout d'un marquage des cellules basales permet d'obtenir une quantification des biomarqueurs dans les cellules épithéliales dans les tissus bénins. Plus spécifiquement l'ajout de p63 et des cytokératines de hauts poids moléculaires permet une identification précise de la présence des tissus bénins évitant ainsi une sur- ou une sous-estimation de la présence des glandes bénignes, par les cellules basales, qui ont pu affecter la qualité et la précision des résultats des études antérieures. Il est à noter que récemment, plusieurs publications ont montré l'importance d'étudier les tissus bénins adjacents à la tumeur qui présente un microenvironnement différent en fonction de sa distance par rapport à la tumeur. Une première étude a mis en évidence qu'une forte expression de la microseminoprotéine- β (MSMB), un biomarqueur sérique du cancer de la prostate, dans les tissus bénins était associé à un grade tumoral plus élevé et agressif (Bergstrom *et al.*, 2018). Une autre étude a rapporté qu'un niveau anormal de méthylation dans les tissus bénins à distance des glandes cancéreuses corrèle avec une forme plus agressive du cancer de la prostate (B. Yang *et al.*, 2019). Dans l'ensemble, ces travaux mettent en perspective la pertinence de l'identification des glandes bénignes dans l'optique d'obtenir des résultats probants même lors de prélèvements de glandes bénignes dans les échantillons de biopsies des patients.

3.2.3 Perfectionnement de l'analyse d'image

L'objectif de ce projet de recherche était aussi, par l'intermédiaire de l'IF, de pouvoir faire une quantification de l'expression de chaque biomarqueur dans les différents compartiments tissulaires (cellules épithéliales et stroma). L'utilisation du multi-marquage permet d'avoir un visuel rapide des différentes zones du tissu cancéreux disponible. De plus, par l'intermédiaire du logiciel d'analyse d'image VisiomorphDP (Visiopharm) et du multi-marquage des différents compartiments tissulaires, il est possible de quantifier chaque biomarqueur de façon spécifique dans chaque compartiment au sein d'une zone tissulaire prédéfinie.

Comme vu précédemment l'utilisation de plusieurs cocktails d'anticorps permet d'identifier les différents compartiments tissulaires au moyen des différents canaux de fluorescence. Ceci permet de quantifier le signal fluorescent dans les cellules épithéliales, dans le stroma mais aussi dans les noyaux et le cytoplasme de chaque sous-type cellulaire. Ces quantifications sont faites grâce à la création et à l'utilisation de différents algorithmes successifs qui déterminent les zones d'intérêts et les moyennes d'intensité de fluorescence dans chacune de ces zones. Un premier algorithme permet de définir la zone totale à analyser pour chaque carotte de tissu. Cet algorithme est basé sur la recherche de noyaux cellulaires *via* le canal du DAPI car ce marquage est présent dans tous les sous types tissulaires. Suite à l'application de cet algorithme, nous excluons manuellement les artéfacts (taches lumineuses, tissu replié) et les zones inappropriées par rapport à l'identification pathologique initiale de chaque carotte de tissu (bénin *versus* tumeur). Cette étape manuelle permettant de localiser et identifier les glandes bénignes, ne peut se faire, tel que précédemment mentionné, que grâce au marquage des cellules basales. Par la suite, un deuxième algorithme identifie les cellules épithéliales dans la zone totale prédéfinie précédemment. Un troisième algorithme soustrait, pour chaque carotte, les cellules épithéliales à la zone totale d'analyse afin de localiser le stroma. Un dernier algorithme va finalement aller chercher, *via* de nouveau le marquage au DAPI, les noyaux de chaque cellule et en déduire les régions cytoplasmiques dans chaque sous-type cellulaire. L'utilisation de cet ensemble d'algorithmes du logiciel VisiomorphDP permet d'obtenir un ensemble de moyennes d'intensité de fluorescence pour chaque compartiment ciblé tel que le cytoplasme et le noyau des cellules épithéliales bénignes, cancéreuses et du stroma. Ces moyennes sont une quantification en valeur continue semi-automatisée et objective de l'expression de chaque biomarqueur dans chacun des compartiments définis.

L'utilisation de micro-étalages tissulaires permet de réunir une quantité importante d'échantillons sur une même lame qui sont alors simultanément traités selon le même protocole de marquage multiple

par IF. Étant donnée le nombre de carottes de tissus présent sur chaque lame et le nombre différents de signaux à quantifier, le processus de numérisation peut être assez long et entraîner une diminution de l'intensité du fluorochrome entre chaque lame. Il peut se traduire par une difficulté à trouver un seuil homogène et commun pour chaque compartiment tissulaire et chaque lame de tissus. Par conséquent, une normalisation de nos résultats est inévitable pour permettre leur appréhension et leur comparaison dans leur globalité. La meilleure normalisation que notre laboratoire, à ce jour, mis au point consiste à faire la moyenne des intensités des carottes présentent sur toutes les lames et la moyenne des intensités de chaque lame. En divisant la moyenne des intensités des carottes de toutes les lames par la moyenne des intensités des carottes de chaque lame, nous obtenons un ratio pour chaque lame. Ces ratios doivent être le plus proche possible de 1, ce qui correspond à une plus faible différence de marquage moyen entre les lames. Finalement, chaque résultat brut des carottes de tissu d'une lame est normalisé en le multipliant par le ratio obtenu pour cette même lame (Dankner *et al.*, 2019) (Communal *et al.*, 2020).

3.3 Potentiel réel des biomarqueurs de ce projet de recherche

Les biomarqueurs étudiés dans ce projet de recherche présentent des résultats prometteurs (sauf ERBB4 et ERBB2) pour permettre une meilleure stratification des patients atteints d'un cancer de la prostate. Cependant, ces quatre biomarqueurs (NOXA, PUMA, EGFR, ERBB3) présentent tous un potentiel en utilisation seuls mais avec une capacité de discrimination des patients différents. En particulier et en raison du nombre de patients et donc du nombre d'évènements de la cohorte utilisée dans le cadre de ce projet de recherche de doctorat, il est légitime de dire que les biomarqueurs inclus ici, avec une expression protéique analysée par IHC ou IF, présentent un meilleur potentiel que ceux présentés dans l'introduction à l'exception de la protéine p65 qui à ce jour a été étudiée dans une cohorte multicentrique regroupant 1512 patients. En regardant les résultats obtenus par Kaplan-Meier pour chaque biomarqueur utilisé seul, ce projet de recherche de doctorat a mis en évidence une association significative entre les biomarqueurs NOXA (LR :14,854, $p < 0,001$), PUMA (LR :8,831, $p = 0,003$) et EGFR (LR :5,861, $p = 0,015$) avec la rechute biochimique. En ce qui concerne le biomarqueur ERBB3, il y a uniquement une tendance d'association avec la rechute biochimique (LR :3,768, $p = 0,052$) alors que le biomarqueur ERBB2 n'a pas présenté d'intérêt pour anticiper le temps avant une rechute biochimique (LR :2,441, $p = 0,118$).

En prenant l'exemple de l'étude des glandes bénignes provenant de patients atteints d'un cancer de la prostate (Article 1), nous avons montré que le suivi en clinique de l'expression de biomarqueurs présents dans ce type de tissu aurait un réel potentiel pour la prise en charge des patients. En outre,

l'analyse de biomarqueurs dans les glandes bénignes lors du prélèvement des biopsies permettra de faire un diagnostic du cancer de la prostate à haut risque chez un patient plus précocement. L'identification de biomarqueurs dans les glandes bénignes sur une étude rétrospective permet de distinguer les patients à haut et à bas risque de progression ce qui pourrait être indicatif, au niveau clinique, lors du prélèvement des biopsies, en complément des méthodes de diagnostic de cancer de la prostate habituelles. Cela permettrait en effet de se faire une meilleure idée des risques de progression du cancer de la prostate et donc de mieux adapter la planification des traitements. Sur les 12 biopsies de diagnostic prélevées sur un patient, même si un grand nombre d'entre elles présenteront une forte proportion de cellules bénignes cela ne veut pas dire qu'il y ait absence de cancer. Il est à noter que le cancer de la prostate peut avoir de très petits foyers tumoraux et que le prélèvement de 12 biopsies représente uniquement un petit volume de la prostate totale. Il y a donc toujours un risque d'obtenir des résultats de type faux négatif. De ce fait, si on est en mesure de tester sur des cellules bénignes la présence de biomarqueurs qui seraient indicatifs d'un risque de cancer, alors cela apportera un outil supplémentaire au clinicien pour le diagnostic mais aussi pour prédire l'évolution de ce cancer. De ce fait, si dans les biopsies la présence de glandes bénignes est associée à des biomarqueurs qui ont une expression de haut niveau alors cela sera un signe significatif supplémentaire pour le clinicien que le cancer a une forte probabilité d'évoluer vers une maladie agressive. À l'opposé, si l'expression de biomarqueurs tels que PUMA et NOXA est faible dans les glandes bénignes, le clinicien pourra raisonnablement envisager que la maladie est à faible risque et donc aiguiller son patient vers une surveillance active. Cela permettra également de réduire l'utilisation de sur-traitements que certains patients peuvent subir alors que leur cancer de la prostate ne progressera pas ou très lentement au cours du temps. La surveillance active, bien que ce ne soit pas à proprement parler un traitement, permet en effet, par l'intermédiaire de suivi régulier, de permettre au patient de conserver une bonne qualité de vie sans nuire à sa survie. Il faut aussi garder en tête que certains patients sous surveillance active peuvent présenter un cancer de la prostate qui va progresser, en incluant le suivi de l'expression de ces biomarqueurs, cela permettra de les identifier plus tôt et donc de leur permettre d'avoir recours à des options thérapeutiques plus adaptées à l'état de leur cancer de la prostate.

Dans l'article 2, nous avons suivi l'expression de biomarqueurs dans les glandes tumorales afin de déterminer leur potentiel à prédire la progression du cancer de la prostate. Le suivi sur du long terme de cette cohorte et l'importance statistique, nous ont permis de nous concentrer sur la progression du cancer de la prostate vers une rechute biochimique, vers le développement de métastases et vers une mortalité spécifique au cancer de la prostate. Parmi les biomarqueurs décrits dans l'introduction, un très faible nombre d'entre eux ont été évalués pour la prédiction du développement des métastases et/ou la

mortalité spécifique au cancer de la prostate. Ceci est attribuable au faible nombre de patients inclus dans chaque cohorte étudiée et à la faible proportion des patients qui vont subir ces complications. La cohorte utilisée dans ce projet de recherche présente l'avantage d'être mature car elle présente un suivi des patients sur du très long terme (suivi médian de la cohorte environ 10 ans), d'avoir un grand nombre de patients et donc un plus grand nombre d'évènements pour les différents devenir des patients atteints d'un cancer de la prostate. Le suivi des patients sur du long terme est important étant donné que le cancer de la prostate est un cancer majoritairement à progression lente. Dans un contexte identique à notre étude avec l'utilisation d'échantillons de prostatectomie radicale provenant de patients atteints d'un cancer de la prostate, nos résultats ont confirmé et renforcé la littérature antérieure. Une forte augmentation de EGFR est associée à la progression du cancer de la prostate (Koumakpayi *et al.*, 2010; Mandel *et al.*, 2018; Schlomm *et al.*, 2007), et une faible expression de ERBB3 est associée à un mauvais pronostic des patients (Koumakpayi *et al.*, 2007). Cependant, l'implication de ERBB2 dans la progression du cancer de la prostate semble incertaine, car certains travaux ont montré qu'un faible niveau d'expression de ERBB2 était associé à un mauvais pronostic (Minner *et al.*, 2010) tandis que d'autres n'ont pas identifié de corrélation (Baek *et al.*, 2012). De plus, toutes ces études publiées dans la littérature ont uniquement investigué la rechute biochimique comme devenir des patients. En tenant en compte que les membres de la famille ERBB forment des homos et des hétérodimères, il est apparu indispensable d'examiner ces protéines en combinaison. C'est donc dans cette optique là que ce projet de recherche a permis d'identifier la meilleure combinaison en incluant les 3 membres (EGFR, ERBB2 et ERBB3) de la famille ERBB dans une cohorte de 285 patients pour la rechute biochimique, le développement des métastases et le décès spécifique par cancer de la prostate. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent qu'une combinaison différente de ERBB pourrait être utile pour la stratification des patients atteints d'un cancer de la prostate après une chirurgie de type prostatectomie radicale. Nous avons démontré que les patients présentant une forte expression de EGFR couplée à une faible expression de ERBB3 étaient 5 fois plus à risque de rechute biochimique. Si à cela, nous ajoutons une faible expression de ERBB2 alors le risque de développer des métastases osseuses est augmenté de 14 fois, et le risque de mortalité spécifique au cancer de la prostate est de 36 fois. Cependant, il est à noter que la quantification de l'expression de ERBB4 dans le cadre du cancer de la prostate a montré de trop faible niveau ne permettant pas de poursuivre les analyses et donc l'obtention de données probantes. À la vue des résultats obtenus pour les biomarqueurs de cette étude, ces derniers se montrent essentiels pour déterminer l'agressivité potentielle de la maladie.

Malgré le potentiel pour une utilisation en clinique que certains des biomarqueurs étudiés ont révélé lors de ce projet de recherche, il sera nécessaire de faire des ajustements avant leur potentiel utilisation en routine au niveau clinique. Dans un premier temps, il sera nécessaire de finaliser la validation de nos résultats sur une cohorte indépendante présentant un plus grand nombre de patients. Ensuite, il faudra établir des niveaux d'expressions de référence et pour cela identifier des seuils de catégorisation reproductibles pour des niveaux faibles, intermédiaires et hauts. Après, il est aussi nécessaire de connaître l'impact de ces biomarqueurs par rapport aux mécanismes biologiques afin de mieux comprendre leur rôle dans la progression de la maladie (Yee *et al.*, 2018). Finalement, il faudra soit inclure la détection de ces biomarqueurs dans des techniques présentement utilisées en clinique soit faire adopter en clinique une nouvelle technique pour la détection et le suivi de l'expression de ces biomarqueurs. Par ailleurs, avant la mise sur le marché d'un nouveau biomarqueur, il est nécessaire d'obtenir une autorisation par les autorités de santé compétentes. Cette autorisation repose sur la bonne balance entre le bénéfice et le risque lors de l'utilisation de ce biomarqueur. Les bénéfices doivent montrer un réel ajout d'informations pour les cliniciens dans leur gestion thérapeutique. Et les risques doivent être minimes avec peu ou pas d'effets secondaires. La sensibilité d'un biomarqueur peut ainsi être mesurer pour sa capacité à donner un résultat positif, tandis que la spécificité qui est son opposé peut être mesurer pour sa capacité à donner un résultat négatif (Srivastava *et al.*, 2018). C'est deux notions sont obtenues en statistique à travers l'utilisation des courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) (Zweig *et al.*, 1993). La courbe théorique avec une discrimination parfaite doit passer par une sensibilité égale à 1 (fraction de vrai positif) et une spécificité égale à 0 (fraction de faux positif), cela se traduit par une aire sous la courbe égale à 1. Pour un tracé théorique sans discrimination, la sensibilité et la spécificité seront toutes les deux égales à 0,5, ce qui correspond à la diagonale de la courbe ROC. Cela veut dire que plus l'aire sous la courbe est élevée et plus le biomarqueur sera robuste (Zweig *et al.*, 1993). Pour chaque biomarqueur de ce projet de recherche, des courbes ROC ont été établies et des aires sous la courbe en ont été déduites pour la rechute biochimique : pour PUMA = 0,527, NOXA = 0,530, EGFR = 0,549, ERBB2 = 0,427 et ERBB3 = 0,461 (Tableau 4). Pour les protéines de la famille ERBB, il y a aussi eu l'exécution de ces courbes ROC pour le développement des métastases EGFR = 0,689, ERBB2 = 0,404 et ERBB3 = 0,362 (Tableau 4); et pour la mort spécifique des patients par le cancer de la prostate EGFR = 0,614, ERBB2 = 0,372 et ERBB3 = 0,289 (Tableau 4).

Tableau 4 : Récapitulatif des données de courbe ROC pour chaque biomarqueur, seul et en combinaison, en fonction des risques d'évolution de la maladie

Rechute biochimique	PUMA : 0,527	Groupe PUMA et NOXA : 0,655
	NOXA : 0,530	
	EGFR : 0,549	Groupe EGFR, ERBB2 et ERBB3 : 0,581
	ERBB2 : 0,427	
	ERBB3 : 0,461	
Développement des métastases	EGFR : 0,689	Groupe EGFR, ERBB2 et ERBB3 : 0,697
	ERBB2 : 0,404	
	ERBB3 : 0,362	
Mort spécifique des patients par cancer de la prostate	EGFR : 0,614	Groupe EGFR, ERBB2 et ERBB3 : 0,725
	ERBB2 : 0,372	
	ERBB3 : 0,289	

3.4 Combinaison des biomarqueurs

Afin de maximiser les connaissances scientifiques avec cette étude, il est paru astucieux de faire des études de combinaison de nos biomarqueurs. En combinant ces biomarqueurs, il y a ajout d'un réel potentiel pour permettre une meilleure stratification des patients atteints d'un cancer de la prostate.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que les études de biomarqueurs seuls donnent des résultats de stratification moins importants que quand nous incluons deux biomarqueurs dans un même système d'analyse (Article 1). Ces résultats montrent que dans le cadre du cancer de la prostate, il ne semble pas possible d'avoir un seul et unique élément qui permette d'avoir une réponse claire concernant la progression de ce cancer. Par conséquent, l'analyse et l'intégration de plusieurs paramètres dans un nomogramme sont nécessaires (Magnetta *et al.*, 2020). Ils intègrent les données cliniques et peuvent être complétés avec toutes informations que les biomarqueurs peuvent apporter. Faire la combinaison des résultats de deux biomarqueurs est très simple car chaque biomarqueur est divisé en deux : haute et faible expression. De ce fait, la combinaison de ces biomarqueurs va produire 4 groupes : faible et faible expression, haute et haute expression et les expressions inversent pour chaque biomarqueur : haute et faible expression. Après avoir obtenu ces 4 groupes, la courbe ROC

correspondante a été établi et il est à noter qu'il y a eu une amélioration de l'aire sous la courbe: PUMA seule = 0,527, NOXA seule = 0,530, alors que pour le groupe PUMA et NOXA = 0,655 (Tableau 4).

Pour aller plus loin, il est possible de faire la combinaison de plus de deux biomarqueurs (Article 2). Malgré une division individuelle de chaque biomarqueur entre haute et faible expression, il n'est pas facile de faire une prédiction juste de la combinaison de biomarqueurs qui mènera à la meilleure stratification du cancer de la prostate. C'est pour cela que nous avons eu recours à l'utilisation du logiciel R afin de créer des arbres décisionnels. Les arbres décisionnels sont une méthode informatique utilisée pour la modélisation d'une classification (Chang *et al.*, 2020). Leur but est de créer un modèle qui va prédire un évènement en combinant plusieurs variables d'entrées. De ce fait, pour la création d'arbres décisionnels, il est nécessaire d'inclure les informations liées à l'évènement à prédire (par exemple : la rechute biochimique) ainsi que les différents biomarqueurs qui sont les variables d'entrées. Un arbre décisionnel est composé de nœuds en arborescence, sous chaque nœud se développe soit une branche soit une feuille. À chaque nœud, il y a une variable d'entrée qui est sélectionnée par le logiciel. La branche correspond à une succession de différents nœuds et donc à une combinaison de variables d'entrées, alors que la feuille est le nœud terminal qui représente le résultat de la classification de la prédiction. Le logiciel va permettre de définir les combinaisons les plus justes pour la prédiction de l'évènement à analyser. En conséquence, l'utilisation d'arbre décisionnel est recommandée pour la combinaison de plus de deux biomarqueurs. Il faut souligner, que plus le biomarqueur sera haut dans l'arbre décisionnel, plus le biomarqueur sera stratifiant pour l'évènement à prédire. Et plus le biomarqueur sera bas dans l'arbre décisionnel, et plus le biomarqueur affinera la stratification de l'évènement à prédire. Après avoir obtenu les différents groupes, la courbe ROC correspondante a été établi et il est à noter qu'il y a eu une amélioration de l'aire sous la courbe pour la rechute biochimique: EGFR seul = 0,549, ERBB2 seul = 0,427 et ERBB3 seul = 0,461, alors que pour le groupe EGFR, ERBB2 et ERBB3 = 0,581 (Tableau 4). Des résultats similaires ont été obtenu pour le développement des métastases EGFR seul = 0,689, ERBB2 seul = 0,404 et ERBB3 seul = 0,362, alors que pour le groupe EGFR, ERBB2 et ERBB3 = 0,697 (Tableau 4); et pour la mortalité spécifique au cancer de la prostate EGFR = 0,614, ERBB2 = 0,372 et ERBB3 = 0,289, alors que pour le groupe EGFR, ERBB2 et ERBB3 = 0,725 (Tableau 4). De ce fait, ces résultats semblent confirmer qu'il est grandement nécessaire de faire un ciblage plus précis des patients afin d'avoir une meilleure approche thérapeutique. De plus, les résultats obtenus dans ce projet de recherche, nous permettent d'augmenter les connaissances qui permettraient d'expliquer les échecs des essais cliniques ciblant ces récepteurs de tyrosines kinases en raison de l'absence du ciblage des patients.

Finalement, maintenant que ces protéines ont montré leur intérêt comme biomarqueurs, il serait intéressant d'avoir comme perspective à ce projet de recherche de doctorat d'aller explorer ces protéines au niveau biologique afin de mieux comprendre le rôle que ces dernières peuvent avoir dans la progression de la maladie du cancer de la prostate.

4 CONCLUSION

Le suivi des niveaux d'expression des biomarqueurs pour prédire leur implication dans la progression du cancer est controversé dans la littérature. Durant les dernières années, plusieurs études dans le cancer de la prostate ont identifié des biomarqueurs prometteurs bien que très peu soit actuellement adopté en clinique. Ce projet de recherche aura permis de confirmer le potentiel de plusieurs biomarqueurs dans le cadre du cancer de la prostate. Plusieurs étapes de mise au point ont permis de faire une normalisation des techniques en vue d'une utilisation en clinique. Ensuite, il a été mis en évidence que suivre la combinaison de l'expression des protéines PUMA et NOXA, dans les glandes bénignes, permet une bonne stratification des patients pour prédire la progression vers une maladie à haut risque. Finalement, l'analyse du potentiel des différentes combinaisons des niveaux d'expression des membres de la famille ERBBs permet d'évaluer les risques de rechute biochimique, de développement de métastases et de mortalité spécifique au cancer de la prostate.

Notre étude de chaque biomarqueur, par immunofluorescence, dans des échantillons de patients atteints d'un cancer de la prostate a permis de confirmer le potentiel de leurs utilisations. En prenant spécifiquement en compte le cancer de la prostate, des résultats peu prometteurs pour l'utilisation de certains biomarqueurs seuls tandis que l'utilisation de ces biomarqueurs en combinaison ont montré un réel potentiel de leurs utilisations. De plus, cette étude montre une mise au point de la technique d'immunofluorescence dans le cadre du cancer de la prostate qui permet de faire une quantification précise à la fois dans les glandes bénignes et tumorales.

En conclusion, notre étude de biomarqueurs met en évidence leurs implications dans le cancer de la prostate bien que les résultats antérieurs portant sur ces mêmes protéines soient assez controversés dans la littérature. Le flou demeure sur la question de l'utilisation de biomarqueurs en clinique pour ce cancer et il est donc nécessaire de faire de plus amples validations en utilisant des cohortes indépendantes et en regroupant un plus grand nombre de patients. Cela permettra d'explorer davantage leur implication dans le cancer de la prostate et donc d'avoir à disposition un plus grand nombre d'outils permettant une plus fine stratification des patients.

5 BIBLIOGRAPHIE

- . (Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer, 2019). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2019*. Toronto, ON: Société canadienne du cancer, 2019. Accessible à cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2019-FR (consulté le [27 juillet 2020]).
- . (U.S. National Library of Medicine, 2013).
- Abate-Shen, C., & Shen, M. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev*, 14(19), 2410-2434. doi:10.1101/gad.819500
- Abd El-Rehim, D. M., Pinder, S. E., Paish, C. E., Bell, J. A., Rampaul, R. S., Blamey, R. W., . . . Ellis, I. O. (2004). Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*, 91(8), 1532-1542. doi:10.1038/sj.bjc.6602184
- Adamo, H. H., Stromvall, K., Nilsson, M., Halin Bergstrom, S., & Bergh, A. (2015). Adaptive (TINT) Changes in the Tumor Bearing Organ Are Related to Prostate Tumor Size and Aggressiveness. *PLoS One*, 10(11), e0141601. doi:10.1371/journal.pone.0141601
- Agarwal, N., Machiels, J. P., Suarez, C., Lewis, N., Higgins, M., Wisinski, K., . . . Elmeliegy, M. (2016). Phase I Study of the Prolactin Receptor Antagonist LFA102 in Metastatic Breast and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncologist*, 21(5), 535-536. doi:10.1634/theoncologist.2015-0502
- Agus, D. B., Akita, R. W., Fox, W. D., Lewis, G. D., Higgins, B., Pisacane, P. I., . . . Sliwkowski, M. X. (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*, 2(2), 127-137. doi:10.1016/s1535-6108(02)00097-1
- Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., & Katki, H. A. (2014). Tracking and evaluating molecular tumor markers with cancer registry data: HER2 and breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 106(5). doi:10.1093/jnci/dju093
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Lubber, B., Nakazawa, M., Roeser, J. C., . . . Luo, J. (2014). AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, 371(11), 1028-1038. doi:10.1056/NEJMoa1315815
- Aoki, V., Sousa, J. X., Jr., Fukumori, L. M., Perigo, A. M., Freitas, E. L., & Oliveira, Z. N. (2010). Direct and indirect immunofluorescence. *An Bras Dermatol*, 85(4), 490-500. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944909>
- Appert-Collin, A., Hubert, P., Cremel, G., & Bennisroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front Pharmacol*, 6, 283. doi:10.3389/fphar.2015.00283
- Arteaga, C. L., & Engelman, J. A. (2014). ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 25(3), 282-303. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.025
- Baek, K. H., Hong, M. E., Jung, Y. Y., Lee, C. H., Lee, T. J., Park, E. S., . . . Lee, S. W. (2012). Correlation of AR, EGFR, and HER2 Expression Levels in Prostate Cancer: Immunohistochemical Analysis and Chromogenic In Situ Hybridization. *Cancer Res Treat*, 44(1), 50-56. doi:10.4143/crt.2012.44.1.50
- Bailar, J. C., 3rd, Mellinger, G. T., & Gleason, D. F. (1966). Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage, and differentiation--preliminary report. *Cancer*

- Chemother Rep*, 50(3), 129-136. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5948715>
- Baiocchi, G., Lopes, A., Coudry, R. A., Rossi, B. M., Soares, F. A., Aguiar, S., . . . Nakagawa, W. T. (2009). ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. *Int J Colorectal Dis*, 24(9), 1059-1068. doi:10.1007/s00384-009-0702-6
- Balk, S. P., Ko, Y. J., & Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*, 21(2), 383-391. doi:10.1200/JCO.2003.02.083
- Barnes, N. L., Khavari, S., Bolland, G. P., Cramer, A., Knox, W. F., & Bundred, N. J. (2005). Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res*, 11(6), 2163-2168. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1633
- Barry, M. J. (2001). Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med*, 344(18), 1373-1377. doi:10.1056/NEJM200105033441806
- Bartlett, J. M., Brawley, D., Grigor, K., Munro, A. F., Dunne, B., & Edwards, J. (2005). Type I receptor tyrosine kinases are associated with hormone escape in prostate cancer. *J Pathol*, 205(4), 522-529. doi:10.1002/path.1735
- Baschong, W., Suetterlin, R., & Laeng, R. H. (2001). Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem*, 49(12), 1565-1572. doi:10.1177/002215540104901210
- Bauer, J. J., Sesterhenn, I. A., Mostofi, F. K., McLeod, D. G., Srivastava, S., & Moul, J. W. (1996). Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 156(4), 1511-1516. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808919>
- Bayani, J., Yao, C. Q., Quintayo, M. A., Yan, F., Haider, S., D'Costa, A., . . . Bartlett, J. M. S. (2017). Molecular stratification of early breast cancer identifies drug targets to drive stratified medicine. *NPJ Breast Cancer*, 3, 3. doi:10.1038/s41523-016-0003-5
- Beach, R., Gown, A. M., De Peralta-Venturina, M. N., Folpe, A. L., Yaziji, H., Salles, P. G., . . . Amin, M. B. (2002). P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol*, 26(12), 1588-1596. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459625>
- Beck, T. N., Georgopoulos, R., Shagisultanova, E. I., Sarcu, D., Handorf, E. A., Dubyk, C., . . . Golemis, E. A. (2016). EGFR and RB1 as Dual Biomarkers in HPV-Negative Head and Neck Cancer. *Mol Cancer Ther*, 15(10), 2486-2497. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0243
- Bellmunt, J., & Oh, W. K. (2010). Castration-resistant prostate cancer: new science and therapeutic prospects. *Ther Adv Med Oncol*, 2(3), 189-207. doi:10.1177/1758834009359769
- Berchuck, A., Kamel, A., Whitaker, R., Kerns, B., Olt, G., Kinney, R., . . . et al. (1990). Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 50(13), 4087-4091. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1972347>

- Bergstrom, S. H., Jaremo, H., Nilsson, M., Adamo, H. H., & Bergh, A. (2018). Prostate tumors downregulate microseminoprotein-beta (MSMB) in the surrounding benign prostate epithelium and this response is associated with tumor aggressiveness. *Prostate*, 78(4), 257-265. doi:10.1002/pros.23466
- Bettencourt, M. C., Bauer, J. J., Sesterhenn, I. A., Connelly, R. R., & Moul, J. W. (1998). CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol*, 160(2), 459-465. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679898>
- Bettencourt, M. C., Bauer, J. J., Sesterhenn, I. A., Mostofi, F. K., McLeod, D. G., & Moul, J. W. (1996). Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol*, 156(3), 1064-1068. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709308>
- Bianchi-Frias, D., Vakar-Lopez, F., Coleman, I. M., Plymate, S. R., Reed, M. J., & Nelson, P. S. (2010). The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PLoS One*, 5(9). doi:10.1371/journal.pone.0012501
- Bickers, B., & Aukim-Hastie, C. (2009). New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer--the post PSA era. *Anticancer Res*, 29(8), 3289-3298. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661347>
- Biomarkers Definitions Working, G. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69(3), 89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989
- Blume-Jensen, P., Berman, D. M., Rimm, D. L., Shipitsin, M., Putzi, M., Nifong, T. P., . . . Saad, F. (2015). Development and clinical validation of an in situ biopsy-based multimarker assay for risk stratification in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 21(11), 2591-2600. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2603
- Boorjian, S. A., Thompson, R. H., Tollefson, M. K., Rangel, L. J., Bergstralh, E. J., Blute, M. L., & Karnes, R. J. (2011). Long-term risk of clinical progression after biochemical recurrence following radical prostatectomy: the impact of time from surgery to recurrence. *Eur Urol*, 59(6), 893-899. doi:10.1016/j.eururo.2011.02.026
- Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M., Hanna, J., . . . Rimm, D. (2010). Antibody validation. *Biotechniques*, 48(3), 197-209. doi:10.2144/000113382
- Brenner, D. R., Weir, H. K., Demers, A. A., Ellison, L. F., Louzado, C., Shaw, A., . . . Canadian Cancer Statistics Advisory, C. (2020). Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *CMAJ*, 192(9), E199-E205. doi:10.1503/cmaj.191292
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, & Walter, P. (2017). *Biologie moléculaire de la cellule*, Sixième édition. Editeur, Lavoisier Médecine Sciences.
- Bryce, A. H., & Antonarakis, E. S. (2016). Androgen receptor splice variant 7 in castration-resistant prostate cancer: Clinical considerations. *Int J Urol*, 23(8), 646-653. doi:10.1111/iju.13134
- Brzezniak, C., Carter, C. A., & Giaccone, G. (2013). Dacomitinib, a new therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother*, 14(2), 247-253. doi:10.1517/14656566.2013.758714
- Bussemakers, M. J., van Bokhoven, A., Verhaegh, G. W., Smit, F. P., Karthaus, H. F., Schalken, J. A., . . . Isaacs, W. B. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly

- overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*, 59(23), 5975-5979. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606244>
- Cai, W., Li, Q., Yang, Z., Miao, X., Wen, Y., Huang, S., & Ouyang, J. (2013). Expression of p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) and C-myc in gallbladder adenocarcinoma and their pathological significance. *Clin Transl Oncol*, 15(10), 818-824. doi:10.1007/s12094-013-1010-8
- Carey, K. D., Garton, A. J., Romero, M. S., Kahler, J., Thomson, S., Ross, S., . . . Sliwkowski, M. X. (2006). Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res*, 66(16), 8163-8171. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0453
- Carpenter, G., King, L., Jr., & Cohen, S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*, 276(5686), 409-410. doi:10.1038/276409a0
- Cartwright, M., & Husain, M. (1986). A model for the control of testosterone secretion. *J Theor Biol*, 123(2), 239-250. doi:10.1016/s0022-5193(86)80158-8
- Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., . . . Andriole, G. L. (1991). Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*, 324(17), 1156-1161. doi:10.1056/NEJM199104253241702
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., & Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 9(5), 351-365. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.027
- Chan, A., Delaloge, S., Holmes, F. A., Moy, B., Iwata, H., Harvey, V. J., . . . Exte, N. E. T. S. G. (2016). Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 17(3), 367-377. doi:10.1016/S1470-2045(15)00551-3
- Chang, M., Canseco, J. A., Nicholson, K. J., Patel, N., & Vaccaro, A. R. (2020). The Role of Machine Learning in Spine Surgery: The Future Is Now. *Front Surg*, 7, 54. doi:10.3389/fsurg.2020.00054
- Cheng, L., Montironi, R., Bostwick, D. G., Lopez-Beltran, A., & Berney, D. M. (2012). Staging of prostate cancer. *Histopathology*, 60(1), 87-117. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04025.x
- Chun, F. K., Karakiewicz, P. I., Briganti, A., Gallina, A., Kattan, M. W., Montorsi, F., . . . Graefen, M. (2006). Prostate cancer nomograms: an update. *Eur Urol*, 50(5), 914-926; discussion 926. doi:10.1016/j.eururo.2006.07.042
- Chung, J. H., & Eng, C. (2005). Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res*, 65(18), 8096-8100. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1888
- Clairefond, S., Peant, B., Ouellet, V., Barres, V., Tian, Z., Trudel, D., . . . Saad, F. (2020). PUMA and NOXA Expression in Tumor-Associated Benign Prostatic Epithelial Cells Are Predictive of Prostate Cancer Biochemical Recurrence. *Cancers (Basel)*, 12(11). doi:10.3390/cancers12113187

- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., & Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6(4), 443-446. doi:10.1038/74704
- Cohen, S., & Levi-Montalcini, R. (1957). Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180. *Cancer Res*, 17(1), 15-20. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13413830>
- Communal, L., Medrano, M., Sircoulomb, F., Paterson, J., Kobel, M., Rahimi, K., . . . Mes-Masson, A. M. (2020). Low junctional adhesion molecule-A expression is associated with an epithelial to mesenchymal transition and poorer outcomes in high-grade serous carcinoma of uterine adnexa. *Mod Pathol*. doi:10.1038/s41379-020-0586-0
- Coons, A. H. (1961). The beginnings of immunofluorescence. *J Immunol*, 87, 499-503. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13881115>
- Coons, A. H., & Kaplan, M. H. (1950). Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med*, 91(1), 1-13. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15395569>
- Cooper, G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. The Development and Causes of Cancer. *Sunderland (MA): Sinauer Associates*; .
- Correia, C., Lee, S. H., Meng, X. W., Vincelette, N. D., Knorr, K. L., Ding, H., . . . Kaufmann, S. H. (2015). Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim Biophys Acta*, 1853(7), 1658-1671. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.03.012
- Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., . . . et al. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230(4730), 1132-1139. doi:10.1126/science.2999974
- Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., . . . Aparicio, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346-352. doi:10.1038/nature10983
- Cuzick, J., Yang, Z. H., Fisher, G., Tikishvili, E., Stone, S., Lanchbury, J. S., . . . Transatlantic Prostate, G. (2013). Prognostic value of PTEN loss in men with conservatively managed localised prostate cancer. *Br J Cancer*, 108(12), 2582-2589. doi:10.1038/bjc.2013.248
- Dai, C., Heemers, H., & Sharifi, N. (2017). Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(9). doi:10.1101/cshperspect.a030452
- Dankner, M., Ouellet, V., Communal, L., Schmitt, E., Perkins, D., Annis, M. G., . . . Canadian Prostate Cancer Biomarker, N. (2019). CCN3/Nephroblastoma Overexpressed Is a Functional Mediator of Prostate Cancer Bone Metastasis That Is Associated with Poor Patient Prognosis. *Am J Pathol*, 189(7), 1451-1461. doi:10.1016/j.ajpath.2019.04.006
- Day, K. C., Lorenzatti Hiles, G., Kozminsky, M., Dawsey, S. J., Paul, A., Brose, L. J., . . . Day, M. L. (2017). HER2 and EGFR Overexpression Support Metastatic Progression of Prostate Cancer to Bone. *Cancer Res*, 77(1), 74-85. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1656

- de Bono, J. S., & Rowinsky, E. K. (2002). The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med*, 8(4 Suppl), S19-26. doi:10.1016/s1471-4914(02)02306-7
- De Marzo, A. M., Haffner, M. C., Lotan, T. L., Yegnasubramanian, S., & Nelson, W. G. (2016). Premalignancy in Prostate Cancer: Rethinking What we Know. *Cancer Prev Res (Phila)*, 9(8), 648-656. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0431
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C. G., . . . Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(4), 256-269. doi:10.1038/nrc2090
- Deeks, E. D. (2017). Neratinib: First Global Approval. *Drugs*, 77(15), 1695-1704. doi:10.1007/s40265-017-0811-4
- Denning, G., Jean-Joseph, B., Prince, C., Durden, D. L., & Vogt, P. K. (2007). A short N-terminal sequence of PTEN controls cytoplasmic localization and is required for suppression of cell growth. *Oncogene*, 26(27), 3930-3940. doi:10.1038/sj.onc.1210175
- Denoix, P. (1952). The TNM staging system. *Bull Inst Nat Hyg*, 7:743.
- Di Lorenzo, G., Tortora, G., D'Armiento, F. P., De Rosa, G., Staibano, S., Autorino, R., . . . Ciardiello, F. (2002). Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 8(11), 3438-3444. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429632>
- di Sant'Agnese, P. A. (1998). Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects. *Urology*, 51(5A Suppl), 121-124. doi:10.1016/s0090-4295(98)00064-8
- Diallo, J. S., Aldejmah, A., Mouhim, A. F., Peant, B., Fahmy, M. A., Koumakpayi, I. H., . . . Saad, F. (2007). NOXA and PUMA expression add to clinical markers in predicting biochemical recurrence of prostate cancer patients in a survival tree model. *Clin Cancer Res*, 13(23), 7044-7052. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1224
- Djavan, B., Zlotta, A., Remzi, M., Ghawidel, K., Basharkhah, A., Schulman, C. C., & Marberger, M. (2000). Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: a prospective study of 1,051 men. *J Urol*, 163(4), 1144-1148; discussion 1148-1149. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737484>
- Donaldson, J. G. (2001). Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 4, Unit 4 3. doi:10.1002/0471143030.cb0403s00
- Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence Staining. *Curr Protoc Cell Biol*, 69, 4 3 1-7. doi:10.1002/0471143030.cb0403s69
- Duffy, M. J., & O'Byrne, K. (2018). Tissue and Blood Biomarkers in Lung Cancer: A Review. *Adv Clin Chem*, 86, 1-21. doi:10.1016/bs.acc.2018.05.001
- Dunn, K. L., Espino, P. S., Drohic, B., He, S., & Davie, J. R. (2005). The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol*, 83(1), 1-14. doi:10.1139/o04-121
- Eastham, J. A., May, R., Robertson, J. L., Sartor, O., & Kattan, M. W. (1999). Development of a nomogram that predicts the probability of a positive prostate biopsy in men with an abnormal digital rectal examination and a prostate-specific

- antigen between 0 and 4 ng/mL. *Urology*, 54(4), 709-713. doi:10.1016/s0090-4295(99)00213-7
- Edwards, J., Traynor, P., Munro, A. F., Pirret, C. F., Dunne, B., & Bartlett, J. M. (2006). The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 12(1), 123-130. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1445
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Epstein, J. I. (2010). An update of the Gleason grading system. *J Urol*, 183(2), 433-440. doi:10.1016/j.juro.2009.10.046
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., Humphrey, P. A., & Grading, C. (2016). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*, 40(2), 244-252. doi:10.1097/PAS.0000000000000530
- Esfahani, M., Ataei, N., & Panjehpour, M. (2015). Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(7), 2601-2611. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25854335>
- Etzioni, R., Tsodikov, A., Mariotto, A., Szabo, A., Falcon, S., Wegelin, J., . . . Feuer, E. (2008). Quantifying the role of PSA screening in the US prostate cancer mortality decline. *Cancer Causes Control*, 19(2), 175-181. doi:10.1007/s10552-007-9083-8
- Fang, S., & Wang, Z. (2014). EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther*, 8, 1595-1611. doi:10.2147/DDDT.S69690
- Ferdinandusse, S., Denis, S., L, I. J., Dacremont, G., Waterham, H. R., & Wanders, R. J. (2000). Subcellular localization and physiological role of alpha-methylacyl-CoA racemase. *J Lipid Res*, 41(11), 1890-1896. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060359>
- Festuccia, C., Gravina, G. L., Biordi, L., D'Ascenzo, S., Dolo, V., Ficorella, C., . . . Tombolini, V. (2009). Effects of EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib in prostate cancer cells in vitro. *Prostate*, 69(14), 1529-1537. doi:10.1002/pros.20995
- Fisher, G., Yang, Z. H., Kudahetti, S., Moller, H., Scardino, P., Cuzick, J., . . . Transatlantic Prostate, G. (2013). Prognostic value of Ki-67 for prostate cancer death in a conservatively managed cohort. *Br J Cancer*, 108(2), 271-277. doi:10.1038/bjc.2012.598
- Fleischmann, A., Rocha, C., Saxer-Sekulic, N., Zlobec, I., Sauter, G., & Thalmann, G. N. (2011). High CD10 expression in lymph node metastases from surgically treated prostate cancer independently predicts early death. *Virchows Arch*, 458(6), 741-748. doi:10.1007/s00428-011-1084-z
- Flinterman, M., Guelen, L., Ezzati-Nik, S., Killick, R., Melino, G., Tominaga, K., . . . Tavassoli, M. (2005). E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J Biol Chem*, 280(7), 5945-5959. doi:10.1074/jbc.M406661200
- Forster, T. H., Stoffel, F., & Gasser, T. C. (2002). Hormone therapy in advanced prostate cancer. *Front Radiat Ther Oncol*, 36, 49-65. doi:10.1159/000061329
- Fradet, V., Lessard, L., Begin, L. R., Karakiewicz, P., Masson, A. M., & Saad, F. (2004). Nuclear factor-kappaB nuclear localization is predictive of biochemical recurrence

- in patients with positive margin prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 10(24), 8460-8464. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0764
- Freedland, S. J., Humphreys, E. B., Mangold, L. A., Eisenberger, M., Dorey, F. J., Walsh, P. C., & Partin, A. W. (2005). Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA*, 294(4), 433-439. doi:10.1001/jama.294.4.433
- Fujita, H., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Itaba, S., Ito, T., Nakata, K., . . . Tanaka, M. (2011). High EGFR mRNA expression is a prognostic factor for reduced survival in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol*, 38(3), 629-641. doi:10.3892/ijo.2011.908
- Fuzio, P., Ditonno, P., Lucarelli, G., Battaglia, M., Bettocchi, C., Senia, T., & Perlino, E. (2011). Androgen deprivation therapy affects BCL-2 expression in human prostate cancer. *Int J Oncol*, 39(5), 1233-1242. doi:10.3892/ijo.2011.1140
- Gannon, P. O., Lessard, L., Stevens, L. M., Forest, V., Begin, L. R., Minner, S., . . . Saad, F. (2013). Large-scale independent validation of the nuclear factor-kappa B p65 prognostic biomarker in prostate cancer. *Eur J Cancer*, 49(10), 2441-2448. doi:10.1016/j.ejca.2013.02.026
- Garraway, L. A., Verweij, J., & Ballman, K. V. (2013). Precision oncology: an overview. *J Clin Oncol*, 31(15), 1803-1805. doi:10.1200/JCO.2013.49.4799
- Garzotto, M., Hudson, R. G., Peters, L., Hsieh, Y. C., Barrera, E., Mori, M., . . . Klein, T. (2003). Predictive modeling for the presence of prostate carcinoma using clinical, laboratory, and ultrasound parameters in patients with prostate specific antigen levels ≤ 10 ng/mL. *Cancer*, 98(7), 1417-1422. doi:10.1002/cncr.11668
- Gaudreau, P. O., Clairefond, S., Class, C. A., Boulay, P. L., Chrobak, P., Allard, B., . . . Stagg, J. (2019). WISP1 is associated to advanced disease, EMT and an inflamed tumor microenvironment in multiple solid tumors. *Oncoimmunology*, 8(5), e1581545. doi:10.1080/2162402X.2019.1581545
- Gaudreau, P. O., Stagg, J., Soulieres, D., & Saad, F. (2016). The Present and Future of Biomarkers in Prostate Cancer: Proteomics, Genomics, and Immunology Advancements. *Biomark Cancer*, 8(Suppl 2), 15-33. doi:10.4137/BIC.S31802
- George, D. J. (2013). Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer Management. *Urology*, 82.
- Glass, G., Papin, J. A., & Mandell, J. W. (2009). SIMPLE: a sequential immunoperoxidase labeling and erasing method. *J Histochem Cytochem*, 57(10), 899-905. doi:10.1369/jhc.2009.953612
- Gordetsky, J., & Epstein, J. (2016). Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. *Diagn Pathol*, 11, 25. doi:10.1186/s13000-016-0478-2
- Grabner, H. U., Friess, H., Kaufmann, B., Willi, D., Zimmermann, A., Korc, M., & Buchler, M. W. (1999). ErbB-4 mRNA expression is decreased in non-metastatic pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 84(1), 24-27. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19990219)84:1<24::aid-ijc5>3.0.co;2-2
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., & Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo j*, 16(7), 1647-1655. doi:10.1093/emboj/16.7.1647

- Grignon, D. J., Caplan, R., Sarkar, F. H., Lawton, C. A., Hammond, E. H., Pilepich, M. V., . . . Cox, J. D. (1997). p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. *J Natl Cancer Inst*, 89(2), 158-165. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8998185>
- Grimsey, N. L., Goodfellow, C. E., Scotter, E. L., Dowie, M. J., Glass, M., & Graham, E. S. (2008). Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal! *J Neurosci Methods*, 171(1), 78-86. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.02.014
- Groskopf, J., Aubin, S. M., Deras, I. L., Blase, A., Bodrug, S., Clark, C., . . . Rittenhouse, H. (2006). APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*, 52(6), 1089-1095. doi:10.1373/clinchem.2005.063289
- Grosset, A. A., Ouellet, V., Caron, C., Fragoso, G., Barres, V., Delvoye, N., . . . Canadian Prostate Cancer Biomarker, N. (2019). Validation of the prognostic value of NF-kappaB p65 in prostate cancer: A retrospective study using a large multi-institutional cohort of the Canadian Prostate Cancer Biomarker Network. *PLoS Med*, 16(7), e1002847. doi:10.1371/journal.pmed.1002847
- Gschwind, A., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(5), 361-370. doi:10.1038/nrc1360
- Gu, J., Zheng, L., Zhang, L., Chen, S., Zhu, M., Li, X., & Wang, Y. (2015). TFF3 and HER2 expression and their correlation with survival in gastric cancer. *Tumour Biol*, 36(4), 3001-3007. doi:10.1007/s13277-014-2933-6
- Guarneri, V., Barbieri, E., Dieci, M. V., Piacentini, F., & Conte, P. (2010). Anti-HER2 neoadjuvant and adjuvant therapies in HER2 positive breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 36 Suppl 3, S62-66. doi:10.1016/S0305-7372(10)70022-0
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hashemi, M., Moradi, N., Rezaei, M., Sanaei, S., Ziaee, S. A., Narouie, B., . . . Ghavami, S. (2016). ERBB4 gene polymorphisms and the risk of prostate cancer in a sample of Iranian Population. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 62(10), 43-48. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27609473>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin Immunol*, 26(3), 253-266. doi:10.1016/j.smim.2014.05.004
- Hayes, D. F., Bast, R. C., Desch, C. E., Fritsche, H., Jr., Kemeny, N. E., Jessup, J. M., . . . Winn, R. J. (1996). Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*, 88(20), 1456-1466. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8841020>
- Heidenreich, A., Pfister, D., Merseburger, A., Bartsch, G., & German Working Group on Castration-Resistant Prostate, C. (2013). Castration-resistant prostate cancer: where we stand in 2013 and what urologists should know. *Eur Urol*, 64(2), 260-265. doi:10.1016/j.eururo.2013.05.021
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*, 25(2), 276-308. doi:10.1210/er.2002-0032

- Henry, G. H., Malewska, A., Joseph, D. B., Malladi, V. S., Lee, J., Torrealba, J., . . . Strand, D. W. (2018). A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Rep*, 25(12), 3530-3542 e3535. doi:10.1016/j.celrep.2018.11.086
- Hernes, E., Fossa, S. D., Berner, A., Otnes, B., & Nesland, J. M. (2004). Expression of the epidermal growth factor receptor family in prostate carcinoma before and during androgen-independence. *Br J Cancer*, 90(2), 449-454. doi:10.1038/sj.bjc.6601536
- Hershko, T., & Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem*, 279(10), 8627-8634. doi:10.1074/jbc.M312866200
- Hirano, D., Okada, Y., Minei, S., Takimoto, Y., & Nemoto, N. (2004). Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur Urol*, 45(5), 586-592; discussion 592. doi:10.1016/j.eururo.2003.11.032
- Holbro, T., Civenni, G., & Hynes, N. E. (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*, 284(1), 99-110. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648469>
- Hoogland, A. M., Kweldam, C. F., & van Leenders, G. J. (2014). Prognostic histopathological and molecular markers on prostate cancer needle-biopsies: a review. *Biomed Res Int*, 2014, 341324. doi:10.1155/2014/341324
- Hornberg, E., Ylitalo, E. B., Crnalic, S., Antti, H., Stattin, P., Widmark, A., . . . Wikstrom, P. (2011). Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One*, 6(4), e19059. doi:10.1371/journal.pone.0019059
- Huang, D. C., & Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 103(6), 839-842. doi:10.1016/s0092-8674(00)00187-2
- Huang, Y. C., Yongchang. (2011). *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Phosphorylation, Signaling and Trafficking in Prostate Cancer*.
- Hubert, P. (2006). Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs. *Bulletin du cancer*, 93, 1-8.
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (1941). Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin*, 22(4), 232-240. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4625049>
- Hwang, C. (2012). Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: a perspective review. *Ther Adv Med Oncol*, 4(6), 329-340. doi:10.1177/1758834012449685
- Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 21(2), 177-184. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.010
- Inoue, T., Segawa, T., Shiraishi, T., Yoshida, T., Toda, Y., Yamada, T., . . . Ogawa, O. (2005). Androgen receptor, Ki67, and p53 expression in radical prostatectomy specimens predict treatment failure in Japanese population. *Urology*, 66(2), 332-337. doi:10.1016/j.urology.2005.02.028
- Isaacs, J. T. (1983). Prostatic structure and function in relation to the etiology of prostatic cancer. *Prostate*, 4(4), 351-366. doi:10.1002/pros.2990040405

- Ismail, H. A., Lessard, L., Mes-Masson, A. M., & Saad, F. (2004). Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate*, 58(3), 308-313. doi:10.1002/pros.10335
- Jamaspishvili, T., Patel, P. G., Niu, Y., Vidotto, T., Caven, I., Livergant, R., . . . Berman, D. M. (2020). Risk stratification of prostate cancer through quantitative assessment of PTEN loss (qPTEN). *J Natl Cancer Inst*. doi:10.1093/jnci/djaa032
- Jansson, A. K., Emterling, A. M., Arbman, G., & Sun, X. F. (2003). Noxa in colorectal cancer: a study on DNA, mRNA and protein expression. *Oncogene*, 22(30), 4675-4678. doi:10.1038/sj.onc.1206655
- Jaques, R., Xu, S., & Matsakas, A. (2020). Evaluating Trastuzumab in the treatment of HER2 positive breast cancer. *Histol Histopathol*, 18221. doi:10.14670/HH-18-221
- Jathal, M. K., Chen, L., Mudryj, M., & Ghosh, P. M. (2011). Targeting ErbB3: the New RTK(id) on the Prostate Cancer Block. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 11(2), 131-149. doi:10.2174/187152211795495643
- Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., . . . Zambetti, G. P. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, 4(4), 321-328. doi:10.1016/s1535-6108(03)00244-7
- Jhavar, S., Bartlett, J., Kovacs, G., Corbishley, C., Dearnaley, D., Eeles, R., . . . Parker, C. (2009). Biopsy tissue microarray study of Ki-67 expression in untreated, localized prostate cancer managed by active surveillance. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 12(2), 143-147. doi:10.1038/pcan.2008.47
- Jia, X., Wang, H., Li, Z., Yan, J., Guo, Y., Zhao, W., . . . Jia, Y. (2020). HER4 promotes the progression of colorectal cancer by promoting epithelialmesenchymal transition. *Mol Med Rep*. doi:10.3892/mmr.2020.10974
- Jimi, E., & Ghosh, S. (2005). Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev*, 208, 80-87. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00329.x
- Johnston, S. R., & Leary, A. (2006). Lapatinib: a novel EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor for cancer. *Drugs Today (Barc)*, 42(7), 441-453. doi:10.1358/dot.2006.42.7.985637
- Kang, M. H., & Reynolds, C. P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 15(4), 1126-1132. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0144
- Karakiewicz, P. I., Benayoun, S., Kattan, M. W., Perrotte, P., Valiquette, L., Scardino, P. T., . . . Graefen, M. (2005). Development and validation of a nomogram predicting the outcome of prostate biopsy based on patient age, digital rectal examination and serum prostate specific antigen. *J Urol*, 173(6), 1930-1934. doi:10.1097/01.ju.0000158039.94467.5d
- Karst, A. M., Dai, D. L., Martinka, M., & Li, G. (2005). PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene*, 24(6), 1111-1116. doi:10.1038/sj.onc.1208374
- Kassen, A., Sutkowski, D. M., Ahn, H., Sensibar, J. A., Kozlowski, J. M., & Lee, C. (1996). Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. *Prostate*, 28(2), 89-97. doi:10.1002/(SICI)1097-0045(199602)28:2<89::AID-PROS3>3.0.CO;2-I

- Kassouf, W., Black, P. C., Tuziak, T., Bondaruk, J., Lee, S., Brown, G. A., . . . Dinney, C. P. (2008). Distinctive expression pattern of ErbB family receptors signifies an aggressive variant of bladder cancer. *J Urol*, 179(1), 353-358. doi:10.1016/j.juro.2007.08.087
- Kew, T. Y., Bell, J. A., Pinder, S. E., Denley, H., Srinivasan, R., Gullick, W. J., . . . Ellis, I. O. (2000). c-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br J Cancer*, 82(6), 1163-1170. doi:10.1054/bjoc.1999.1057
- Khor, L. Y., Bae, K., Paulus, R., Al-Saleem, T., Hammond, M. E., Grignon, D. J., . . . Pollack, A. (2009). MDM2 and Ki-67 predict for distant metastasis and mortality in men treated with radiotherapy and androgen deprivation for prostate cancer: RTOG 92-02. *J Clin Oncol*, 27(19), 3177-3184. doi:10.1200/JCO.2008.19.8267
- Kim, H., Choi, J. Y., Rah, Y. C., Ahn, J. C., Kim, H., Jeong, W. J., & Ahn, S. H. (2020). ErbB3, a possible prognostic factor of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. doi:10.1016/j.oooo.2019.12.006
- Kohaar, I., Petrovics, G., & Srivastava, S. (2019). A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers: Opportunities and Challenges. *Int J Mol Sci*, 20(8). doi:10.3390/ijms20081813
- Kolodziej, M. (2014). Management of biochemically recurrent prostate cancer following local therapy. *Am J Manag Care*, 20(12 Suppl), S273-281. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734963>
- Konecny, G. E., Pegram, M. D., Venkatesan, N., Finn, R., Yang, G., Rahmeh, M., . . . Slamon, D. J. (2006). Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res*, 66(3), 1630-1639. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1182
- Kosmidou, V., Vlassi, M., Anagiotos, K., Raftopoulou, S., Kalogerakou, E., Skarmalioraki, S., . . . Pintzas, A. (2020). Noxa upregulation and 5-gene apoptotic biomarker panel in colorectal cancer. *Eur J Clin Invest*, e13353. doi:10.1111/eci.13353
- Koumakpayi, I. H., Diallo, J. S., Le Page, C., Lessard, L., Filali-Mouhim, A., Begin, L. R., . . . Saad, F. (2007). Low nuclear ErbB3 predicts biochemical recurrence in patients with prostate cancer. *BJU Int*, 100(2), 303-309. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.06992.x
- Koumakpayi, I. H., Diallo, J. S., Le Page, C., Lessard, L., Gleave, M., Begin, L. R., . . . Saad, F. (2006). Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 12(9), 2730-2737. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2242
- Koumakpayi, I. H., Le Page, C., Mes-Masson, A. M., & Saad, F. (2010). Hierarchical clustering of immunohistochemical analysis of the activated ErbB/PI3K/Akt/NF-kappaB signalling pathway and prognostic significance in prostate cancer. *Br J Cancer*, 102(7), 1163-1173. doi:10.1038/sj.bjc.6605571
- Kovacheva, V. N., & Rajpoot, N. M. (2016). Subcellular protein expression models for microsatellite instability in colorectal adenocarcinoma tissue images. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 430. doi:10.1186/s12859-016-1243-y
- Kroeger, D. R., Milne, K., & Nelson, B. H. (2016). Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*, 22(12), 3005-3015. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2762

- Kuchma, M. H., Kim, J. H., Muller, M. T., & Arlen, P. A. (2012). Prostate cancer cell surface-associated keratin 8 and its implications for enhanced plasmin activity. *Protein J*, 31(3), 195-205. doi:10.1007/s10930-011-9388-z
- Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol*, 5(10), 588-599. doi:10.1038/ncponc1187
- Kupelian, P. A., Mahadevan, A., Reddy, C. A., Reuther, A. M., & Klein, E. A. (2006). Use of different definitions of biochemical failure after external beam radiotherapy changes conclusions about relative treatment efficacy for localized prostate cancer. *Urology*, 68(3), 593-598. doi:10.1016/j.urology.2006.03.075
- Kurita, T., Medina, R. T., Mills, A. A., & Cunha, G. R. (2004). Role of p63 and basal cells in the prostate. *Development*, 131(20), 4955-4964. doi:10.1242/dev.01384
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*, 17(4), 525-535. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.003
- Labbe, D. P., Sweeney, C. J., Brown, M., Galbo, P., Rosario, S., Wadosky, K. M., . . . Ellis, L. (2017). TOP2A and EZH2 Provide Early Detection of an Aggressive Prostate Cancer Subgroup. *Clin Cancer Res*, 23(22), 7072-7083. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0413
- Labouba, I., Le Page, C., Communal, L., Kristessen, T., You, X., Peant, B., . . . Saad, F. (2015). Potential Cross-Talk between Alternative and Classical NF-kappaB Pathways in Prostate Cancer Tissues as Measured by a Multi-Staining Immunofluorescence Co-Localization Assay. *PLoS One*, 10(7), e0131024. doi:10.1371/journal.pone.0131024
- Le Page, C., Koumakpayi, I. H., Lessard, L., Mes-Masson, A. M., & Saad, F. (2005). EGFR and Her-2 regulate the constitutive activation of NF-kappaB in PC-3 prostate cancer cells. *Prostate*, 65(2), 130-140. doi:10.1002/pros.20234
- Leclerc, B. G., Charlebois, R., Chouinard, G., Allard, B., Pommey, S., Saad, F., & Stagg, J. (2016). CD73 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 22(1), 158-166. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1181
- Lee, D. H., Kim, C., Zhang, L., & Lee, Y. J. (2008). Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 75(10), 2020-2033. doi:10.1016/j.bcp.2008.02.023
- Lee, S. O., Tian, J., Huang, C. K., Ma, Z., Lai, K. P., Hsiao, H., . . . Chang, C. (2012). Suppressor role of androgen receptor in proliferation of prostate basal epithelial and progenitor cells. *J Endocrinol*, 213(2), 173-182. doi:10.1530/JOE-11-0474
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
- Lessard, L., Karakiewicz, P. I., Bellon-Gagnon, P., Alam-Fahmy, M., Ismail, H. A., Mes-Masson, A. M., & Saad, F. (2006). Nuclear localization of nuclear factor-kappaB p65 in primary prostate tumors is highly predictive of pelvic lymph node metastases. *Clin Cancer Res*, 12(19), 5741-5745. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0330

- Lessard, L., Mes-Masson, A. M., Lamarre, L., Wall, L., Lattouf, J. B., & Saad, F. (2003). NF-kappa B nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. *BJU Int*, 91(4), 417-420. doi:10.1046/j.1464-410x.2003.04104.x
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., & Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2(3), 183-192. doi:10.1016/s1535-6108(02)00127-7
- Levine, B., Sinha, S. C., & Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), 600-606. doi:10.4161/auto.6260
- Li, R., Heydon, K., Hammond, M. E., Grignon, D. J., Roach, M., 3rd, Wolkov, H. B., . . . Pollack, A. (2004). Ki-67 staining index predicts distant metastasis and survival in locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy: an analysis of patients in radiation therapy oncology group protocol 86-10. *Clin Cancer Res*, 10(12 Pt 1), 4118-4124. doi:10.1158/1078-0432.CCR-1052-03
- Li, R., Wheeler, T., Dai, H., Frolov, A., Thompson, T., & Ayala, G. (2004). High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol*, 28(7), 928-934. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15223964>
- Lièvre, A., & Laurent-Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro digest*, 11(1). doi:10.4267/2042/30747
- Lin, X., Kapoor, A., Gu, Y., Chow, M. J., Xu, H., Major, P., & Tang, D. (2019). Assessment of biochemical recurrence of prostate cancer (Review). *Int J Oncol*, 55(6), 1194-1212. doi:10.3892/ijo.2019.4893
- Liu, G., Chen, Y. H., Kolesar, J., Huang, W., Dipaola, R., Pins, M., . . . Wilding, G. (2013). Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial of lapatinib in men with biochemically relapsed, androgen dependent prostate cancer. *Urol Oncol*, 31(2), 211-218. doi:10.1016/j.urolonc.2011.01.002
- Liu, L., Shao, X., Gao, W., Bai, J., Wang, R., Huang, P., . . . Shu, Y. (2010). The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data. *J Thorac Oncol*, 5(12), 1922-1932. doi:10.1097/jto.0b013e3181f26266
- Lo, C. S., Sanii, S., Kroeger, D. R., Milne, K., Talhouk, A., Chiu, D. S., . . . Nelson, B. H. (2016). Neoadjuvant chemotherapy of ovarian cancer results in three patterns of tumor-infiltrating lymphocyte response with distinct implications for immunotherapy. *Clin Cancer Res*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1433
- Lo Nigro, C., Ricci, V., Vivenza, D., Granetto, C., Fabozzi, T., Miraglio, E., & Merlano, M. C. (2016). Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. *World J Gastroenterol*, 22(30), 6944-6954. doi:10.3748/wjg.v22.i30.6944
- Long, R. M., Morrissey, C., Fitzpatrick, J. M., & Watson, R. W. (2005). Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci (Lond)*, 108(1), 1-11. doi:10.1042/CS20040241
- Lorenzo, G. D., Bianco, R., Tortora, G., & Ciardiello, F. (2003). Involvement of growth factor receptors of the epidermal growth factor receptor family in prostate cancer

- development and progression to androgen independence. *Clin Prostate Cancer*, 2(1), 50-57. doi:10.3816/cgc.2003.n.013
- Lu, Y., Liu, Y., Zeng, J., He, Y., Peng, Q., Deng, Y., . . . Li, S. (2014). Association of p53 codon 72 polymorphism with prostate cancer: an update meta-analysis. *Tumour Biol*, 35(5), 3997-4005. doi:10.1007/s13277-014-1657-y
- Maeda, O., & Ando, Y. (2019). Recent progress of chemotherapy and biomarkers for gastroesophageal cancer. *World J Gastrointest Oncol*, 11(7), 518-526. doi:10.4251/wjgo.v11.i7.518
- Magnetta, M. J., Casalino, D., & Heller, M. T. (2020). Imaging assessment of local recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *Abdom Radiol (NY)*. doi:10.1007/s00261-020-02505-7
- Mandel, A., Larsson, P., Sarwar, M., Semenas, J., Syed Khaja, A. S., & Persson, J. L. (2018). The interplay between AR, EGF receptor and MMP-9 signaling pathways in invasive prostate cancer. *Mol Med*, 24(1), 34. doi:10.1186/s10020-018-0035-4
- Mayeux, R. (2004). Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx*, 1(2), 182-188. doi:10.1602/neurorx.1.2.182
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2(1), 35-49. doi:10.1002/pros.2990020105
- Menard, S., Fortis, S., Castiglioni, F., Agresti, R., & Balsari, A. (2001). HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology*, 61 Suppl 2, 67-72. doi:10.1159/000055404
- Mendelsohn, J., & Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*, 19(56), 6550-6565. doi:10.1038/sj.onc.1204082
- Miayake, H., Tolcher, A., & Gleave, M. E. (2000). Chemosensitization and delayed androgen-independent recurrence of prostate cancer with the use of antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides. *J Natl Cancer Inst*, 92(1), 34-41. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10620631>
- Michalak, E. M., Jansen, E. S., Hoppo, L., Cragg, M. S., Tai, L., Smyth, G. K., . . . Scott, C. L. (2009). Puma and to a lesser extent Noxa are suppressors of Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ*, 16(5), 684-696. doi:10.1038/cdd.2008.195
- Michel, M. C., Wieland, T., & Tsujimoto, G. (2009). How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379(4), 385-388. doi:10.1007/s00210-009-0395-y
- Mineo, J. F., Bordron, A., Baroncini, M., Maurage, C. A., Ramirez, C., Siminski, R. M., . . . Dam Hieu, P. (2007). Low HER2-expressing glioblastomas are more often secondary to anaplastic transformation of low-grade glioma. *J Neurooncol*, 85(3), 281-287. doi:10.1007/s11060-007-9424-1
- Minner, S., Jessen, B., Stiedenroth, L., Burandt, E., Kollermann, J., Mirlacher, M., . . . Schlomm, T. (2010). Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 16(5), 1553-1560. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2546
- Mishra, R., Patel, H., Alanazi, S., Yuan, L., & Garrett, J. T. (2018). HER3 signaling and targeted therapy in cancer. *Oncol Rev*, 12(1), 355. doi:10.4081/oncol.2018.355
- Mitsudomi, T., & Yatabe, Y. (2010). Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J*, 277(2), 301-308. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07448.x

- Mohler, J. L., Armstrong, A. J., Bahnson, R. R., D'Amico, A. V., Davis, B. J., Eastham, J. A., . . . Freedman-Cass, D. A. (2016). Prostate Cancer, Version 1.2016. *J Natl Compr Canc Netw*, 14(1), 19-30. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733552>
- Mori, H., & Cardiff, R. D. (2016). Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. *Methods Mol Biol*, 1458, 1-12. doi:10.1007/978-1-4939-3801-8_1
- Morrison, C., Zanagnolo, V., Ramirez, N., Cohn, D. E., Kelbick, N., Copeland, L., . . . Fowler, J. M. (2006). HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol*, 24(15), 2376-2385. doi:10.1200/JCO.2005.03.4827
- Muniyan, S., Chen, S. J., Lin, F. F., Wang, Z., Mehta, P. P., Batra, S. K., & Lin, M. F. (2015). ErbB-2 signaling plays a critical role in regulating androgen-sensitive and castration-resistant androgen receptor-positive prostate cancer cells. *Cell Signal*, 27(11), 2261-2271. doi:10.1016/j.cellsig.2015.08.002
- Murray, N. P., Reyes, E., Fuentealba, C., Jacob, O., & Orellana, N. (2015). Possible Role of HER-2 in the Progression of Prostate Cancer from Primary Tumor to Androgen Independence. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(15), 6615-6619. doi:10.7314/apjcp.2015.16.15.6615
- Nagle, R. B., Ahmann, F. R., McDaniel, K. M., Paquin, M. L., Clark, V. A., & Celniker, A. (1987). Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res*, 47(1), 281-286. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2431765>
- Nagle, R. B., Brawer, M. K., Kittelson, J., & Clark, V. (1991). Phenotypic relationships of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostatic carcinoma. *Am J Pathol*, 138(1), 119-128. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1987760>
- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7(3), 683-694. doi:10.1016/s1097-2765(01)00214-3
- Nakazawa, M., Lu, C., Chen, Y., Paller, C. J., Carducci, M. A., Eisenberger, M. A., . . . Antonarakis, E. S. (2015). Serial blood-based analysis of AR-V7 in men with advanced prostate cancer. *Ann Oncol*, 26(9), 1859-1865. doi:10.1093/annonc/mdv282
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3448-3459. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.001
- Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A., Maiello, M. R., & Salomon, D. S. (2003). Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer*, 10(1), 1-21.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., . . . Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053-1058. doi:10.1126/science.288.5468.1053
- Oldenhuis, C. N., Oosting, S. F., Gietema, J. A., & de Vries, E. G. (2008). Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*, 44(7), 946-953. doi:10.1016/j.ejca.2008.03.006

- Onstenk, W., Sieuwerts, A. M., Kraan, J., Van, M., Nieuweboer, A. J., Mathijssen, R. H., . . . Sleijfer, S. (2015). Efficacy of Cabazitaxel in Castration-resistant Prostate Cancer Is Independent of the Presence of AR-V7 in Circulating Tumor Cells. *Eur Urol*, 68(6), 939-945. doi:10.1016/j.eururo.2015.07.007
- Packer, J. R., & Maitland, N. J. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1863(6 Pt A), 1238-1260. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.02.016
- Parsons, J. K., Gage, W. R., Nelson, W. G., & De Marzo, A. M. (2001). p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. *Urology*, 58(4), 619-624. doi:10.1016/s0090-4295(01)01311-5
- Peant, B., Forest, V., Trudeau, V., Latour, M., Mes-Masson, A. M., & Saad, F. (2011). IkkappaB-Kinase-epsilon (IKKepsilon/IKKi/IkkappaBKepsilon) expression and localization in prostate cancer tissues. *Prostate*, 71(10), 1131-1138. doi:10.1002/pros.21329
- Peng, S. L., Yao, D. B., Zhao, Y., Xu, F., Jia, C. J., Xu, Y. Q., & Dai, C. L. (2015). Prognostic value of PUMA expression in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(1), 38-44. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25635973>
- Pepe, M. S., Etzioni, R., Feng, Z., Potter, J. D., Thompson, M. L., Thornquist, M., . . . Yasui, Y. (2001). Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93(14), 1054-1061. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459866>
- Peraldo-Neia, C., Migliardi, G., Mello-Grand, M., Montemurro, F., Segir, R., Pignochino, Y., . . . Aglietta, M. (2011). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer*, 11, 31. doi:10.1186/1471-2407-11-31
- Petrescu, A., Marzan, L., Codreanu, O., & Niculescu, L. (2006). Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*, 47(2), 143-146. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17106522>
- Petrovics, G., Liu, A., Shaheduzzaman, S., Furusato, B., Sun, C., Chen, Y., . . . Srivastava, S. (2005). Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene*, 24(23), 3847-3852. doi:10.1038/sj.onc.1208518
- Ploner, C., Kofler, R., & Villunger, A. (2008). Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S84-92. doi:10.1038/onc.2009.46
- Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., . . . Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5), 1746-1750.
- Plowman, G. D., Whitney, G. S., Neubauer, M. G., Green, J. M., McDonald, V. L., Todaro, G. J., & Shoyab, M. (1990). Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(13), 4905-4909.

- Polascik, T. J., Oesterling, J. E., & Partin, A. W. (1999). Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol*, 162(2), 293-306. doi:10.1016/s0022-5347(05)68543-6
- Pound, C. R., Partin, A. W., Eisenberger, M. A., Chan, D. W., Pearson, J. D., & Walsh, P. C. (1999). Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*, 281(17), 1591-1597. doi:10.1001/jama.281.17.1591
- Priemer, D. S., Montironi, R., Wang, L., Williamson, S. R., Lopez-Beltran, A., & Cheng, L. (2016). Neuroendocrine Tumors of the Prostate: Emerging Insights from Molecular Data and Updates to the 2016 World Health Organization Classification. *Endocr Pathol*, 27(2), 123-135. doi:10.1007/s12022-016-9421-z
- Putzke, A. P., Ventura, A. P., Bailey, A. M., Akture, C., Opoku-Ansah, J., Celiktaş, M., . . . Knudsen, B. S. (2011). Metastatic progression of prostate cancer and e-cadherin regulation by zeb1 and SRC family kinases. *Am J Pathol*, 179(1), 400-410. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.028
- Puvanenthiran, S., Essapen, S., Haagsma, B., Bagwan, I., Green, M., Khelwatty, S. A., . . . Modjtahedi, H. (2018). Co-expression and prognostic significance of the HER family members, EGFRvIII, c-MET, CD44 in patients with ovarian cancer. *Oncotarget*, 9(28), 19662-19674. doi:10.18632/oncotarget.24791
- Qu, Y., Dai, B., Ye, D., Kong, Y., Chang, K., Jia, Z., . . . Shi, G. (2015). Constitutively active AR-V7 plays an essential role in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Sci Rep*, 5, 7654. doi:10.1038/srep07654
- Quinlan, D. M., Partin, A. W., & Walsh, P. C. (1995). Can aggressive prostatic carcinomas be identified and can their natural history be altered by treatment? *Urology*, 46(3 Suppl A), 77-82. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7653023>
- Ramieri, M. T., Murari, R., Botti, C., Pica, E., Zotti, G., & Alo, P. L. (2010). Detection of HER2 amplification using the SISH technique in breast, colon, prostate, lung and ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 30(4), 1287-1292. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530441>
- Ramirez, M. L., Nelson, E. C., & Evans, C. P. (2008). Beyond prostate-specific antigen: alternate serum markers. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 11(3), 216-229. doi:10.1038/pcan.2008.2
- Reis, H., Herold, T., Ting, S., Worm, K., Huber, U., Christoph, D. C., . . . Wiesweg, M. (2015). HER2 expression and markers of phosphoinositide-3-kinase pathway activation define a favorable subgroup of metastatic pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer*, 88(1), 34-41. doi:10.1016/j.lungcan.2015.02.002
- Reungwetwattana, T., & Dy, G. K. (2013). Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer. *J Carcinog*, 12, 22. doi:10.4103/1477-3163.123972
- Rhee, H., Gunter, J. H., Heathcote, P., Ho, K., Stricker, P., Corcoran, N. M., & Nelson, C. C. (2015). Adverse effects of androgen-deprivation therapy in prostate cancer and their management. *BJU Int*, 115 Suppl 5, 3-13. doi:10.1111/bju.12964
- Rhodes, D. R., Sanda, M. G., Otte, A. P., Chinnaiyan, A. M., & Rubin, M. A. (2003). Multiplex biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95(9), 661-668. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734317>
- Roberts, C. G., Millar, E. K., O'Toole, S. A., McNeil, C. M., Lehrbach, G. M., Pinese, M., . . . Butt, A. J. (2011). Identification of PUMA as an estrogen target gene that

- mediates the apoptotic response to tamoxifen in human breast cancer cells and predicts patient outcome and tamoxifen responsiveness in breast cancer. *Oncogene*, 30(28), 3186-3197. doi:10.1038/onc.2011.36
- Robertson, D., Savage, K., Reis-Filho, J. S., & Isacke, C. M. (2008). Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol*, 9, 13. doi:10.1186/1471-2121-9-13
- Robinson, D., He, F., Pretlow, T., & Kung, H. J. (1996). A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12), 5958-5962.
- Roskoski, R., Jr. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*, 79, 34-74. doi:10.1016/j.phrs.2013.11.002
- Ross, P. L., Scardino, P. T., & Kattan, M. W. (2001). A catalog of prostate cancer nomograms. *J Urol*, 165(5), 1562-1568. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342918>
- Rowinsky, E. K. (2004). The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med*, 55, 433-457. doi:10.1146/annurev.med.55.091902.104433
- Rubin, M. A., Bismar, T. A., Andren, O., Mucci, L., Kim, R., Shen, R., . . . Johansson, J. E. (2005). Decreased alpha-methylacyl CoA racemase expression in localized prostate cancer is associated with an increased rate of biochemical recurrence and cancer-specific death. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(6), 1424-1432. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0801
- Ruiz-Camps, I., & Aguilar-Company, J. (2020). Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Other Tyrosine Kinase Inhibitors for Solid Tumors. *Infect Dis Clin North Am*. doi:10.1016/j.idc.2020.02.005
- Ruppert, A. M., Wislez, M., Poulot, V., Lacave, R., Antoine, M., & Cadranel, J. (2011). [A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway]. *Rev Mal Respir*, 28(4), 565-577. doi:10.1016/j.rmr.2011.03.005
- Saad, F. (2003). Bisphosphonates in prostate cancer: where are we and where should we go? *J Natl Cancer Inst*, 95(17), 1262-1263. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12953073>
- Saad, F., Chi, K. N., Finelli, A., Hotte, S. J., Izawa, J., Kapoor, A., . . . Fleshner, N. E. (2015). The 2015 CUA-CUOG Guidelines for the management of castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Can Urol Assoc J*, 9(3-4), 90-96. doi:10.5489/cuaj.2526
- Saad, F., McCormack, M. (2019). Le cancer de la prostate : Comprendre la maladie et ses traitements, 5e édition. Retrieved from <https://www.cua.org/fr/information-des-patients>
- Santin, A. D., Bellone, S., Roman, J. J., McKenney, J. K., & Pecorelli, S. (2008). Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu. *Int J Gynaecol Obstet*, 102(2), 128-131. doi:10.1016/j.ijgo.2008.04.008
- Sassen, A., Rochon, J., Wild, P., Hartmann, A., Hofstaedter, F., Schwarz, S., & Brockhoff, G. (2008). Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 10(1), R2. doi:10.1186/bcr1843

- Schalken, J. A., Hessels, D., & Verhaegh, G. (2003). New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*, 62(5 Suppl 1), 34-43. doi:10.1016/s0090-4295(03)00759-3
- Schiller, J. H., von Pawel, J., Schutt, P., Ansari, R. H., Thomas, M., Saleh, M., . . . Socinski, M. A. (2010). Pemetrexed with or without matuzumab as second-line treatment for patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 5(12), 1977-1985. doi:10.1097/JTO.0b013e3181f4a5c9
- Schlessinger, J. (2014). Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(3). doi:10.1101/cshperspect.a008912
- Schlomm, T., Kirstein, P., Iwers, L., Daniel, B., Steuber, T., Walz, J., . . . Erbersdobler, A. (2007). Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 13(22 Pt 1), 6579-6584. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1257
- Schuette, W., Behringer, D., Stoehlmacher, J., Kollmeier, J., Schmager, S., Fischer von Weikersthal, L., . . . Buchmann, J. (2015). CHAMP: A Phase II Study of Panitumumab With Pemetrexed and Cisplatin Versus Pemetrexed and Cisplatin in the Treatment of Patients With Advanced-Stage Primary Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer With Particular Regard to the KRAS Status. *Clin Lung Cancer*, 16(6), 447-456. doi:10.1016/j.clcc.2015.05.009
- Segers, V. F. M., Dugaucquier, L., Feyen, E., Shakeri, H., & De Keulenaer, G. W. (2020). The role of ErbB4 in cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. doi:10.1007/s13402-020-00499-4
- Sequist, L. V., Gray, J. E., Harb, W. A., Lopez-Chavez, A., Doebele, R. C., Modiano, M. R., . . . Shepherd, F. A. (2019). Randomized Phase II Trial of Seribantumab in Combination with Erlotinib in Patients with EGFR Wild-Type Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*, 24(8), 1095-1102. doi:10.1634/theoncologist.2018-0695
- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a008714. doi:10.1101/cshperspect.a008714
- Shariat, S. F., Kattan, M. W., Vickers, A. J., Karakiewicz, P. I., & Scardino, P. T. (2009). Critical review of prostate cancer predictive tools. *Future Oncol*, 5(10), 1555-1584. doi:10.2217/fon.09.121
- Shawver, L. K., Slamon, D., & Ullrich, A. (2002). Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell*, 1(2), 117-123. doi:10.1016/s1535-6108(02)00039-9
- Shen, R. R., & Hahn, W. C. (2011). Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene*, 30(6), 631-641. doi:10.1038/onc.2010.493
- Shibue, T., Suzuki, S., Okamoto, H., Yoshida, H., Ohba, Y., Takaoka, A., & Taniguchi, T. (2006). Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways. *Embo j*, 25(20), 4952-4962. doi:10.1038/sj.emboj.7601359
- Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., . . . Ushio, Y. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, 63(20), 6962-6970. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14583498>
- Shipitsin, M., Small, C., Choudhury, S., Giladi, E., Friedlander, S., Nardone, J., . . . Blume-Jensen, P. (2014). Identification of proteomic biomarkers predicting prostate

- cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error. *Br J Cancer*, 111(6), 1201-1212. doi:10.1038/bjc.2014.396
- Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., Garraway, L., . . . Loda, M. (2000). p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol*, 157(6), 1769-1775. doi:10.1016/S0002-9440(10)64814-6
- Sinicrope, F. A., Rego, R. L., Okumura, K., Foster, N. R., O'Connell, M. J., Sargent, D. J., & Windschitl, H. E. (2008). Prognostic impact of bim, puma, and noxa expression in human colon carcinomas. *Clin Cancer Res*, 14(18), 5810-5818. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5202
- Skirnisdottir, I., & Seidal, T. (2012). The apoptosis regulators p53, bax and PUMA: Relationship and impact on outcome in early stage (FIGO I-II) ovarian carcinoma after post-surgical taxane-based treatment. *Oncol Rep*, 27(3), 741-747. doi:10.3892/or.2011.1578
- Skowronek, J. (2013). Low-dose-rate or high-dose-rate brachytherapy in treatment of prostate cancer - between options. *J Contemp Brachytherapy*, 5(1), 33-41. doi:10.5114/jcb.2013.34342
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177-182. doi:10.1126/science.3798106
- Smith, M. B., Reardon, J., & Olson, E. M. (2012). Pertuzumab for the treatment of patients with previously untreated HER2-positive metastatic breast cancer. *Drugs Today (Barc)*, 48(11), 713-722. doi:10.1358/dot.2012.48.11.1885879
- Smith, M. R., Coleman, R. E., Klotz, L., Pittman, K., Milecki, P., Ng, S., . . . Fizazi, K. (2015). Denosumab for the prevention of skeletal complications in metastatic castration-resistant prostate cancer: comparison of skeletal-related events and symptomatic skeletal events. *Ann Oncol*, 26(2), 368-374. doi:10.1093/annonc/mdu519
- Smith, M. R., Egerdie, B., Hernandez Toriz, N., Feldman, R., Tammela, T. L., Saad, F., . . . Denosumab, H. P. C. S. G. (2009). Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med*, 361(8), 745-755. doi:10.1056/NEJMoa0809003
- Snyder, L. C., Astsaturov, I., & Weiner, L. M. (2005). Overview of monoclonal antibodies and small molecules targeting the epidermal growth factor receptor pathway in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 5 Suppl 2, S71-80. doi:10.3816/cc.2005.s.010
- Socinski, M. A. (2007). Antibodies to the epidermal growth factor receptor in non small cell lung cancer: current status of matuzumab and panitumumab. *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 2), s4597-4601. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0335
- Solca, F., Dahl, G., Zoephel, A., Bader, G., Sanderson, M., Klein, C., . . . Adolf, G. R. (2012). Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther*, 343(2), 342-350. doi:10.1124/jpet.112.197756
- Sountoulides, P., & Rountos, T. (2013). Adverse effects of androgen deprivation therapy for prostate cancer: prevention and management. *ISRN Urol*, 2013, 240108. doi:10.1155/2013/240108

- Sperlich, C., & Saad, F. (2013). Optimal management of patients receiving cabazitaxel-based chemotherapy. *Can Urol Assoc J*, 7(1-2 Suppl 1), S18-24. doi:10.5489/cuaj.275
- Spigel, D. R., Mekhail, T. M., Waterhouse, D., Hadley, T., Webb, C., Burris, H. A., 3rd, . . . Greco, F. A. (2017). First-Line Carboplatin, Pemetrexed, and Panitumumab in Patients with Advanced Non-Squamous KRAS Wild Type (WT) Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Cancer Invest*, 35(8), 541-546. doi:10.1080/07357907.2017.1344698
- Strigley, J. R., Delahunt, B., Samaratunga, H., Billis, A., Cheng, L., Clouston, D., . . . Egevad, L. (2019). Controversial issues in Gleason and International Society of Urological Pathology (ISUP) prostate cancer grading: proposed recommendations for international implementation. *Pathology*, 51(5), 463-473. doi:10.1016/j.pathol.2019.05.001
- Srinivas, P. R., Kramer, B. S., & Srivastava, S. (2001). Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol*, 2(11), 698-704. doi:10.1016/S1470-2045(01)00560-5
- Srivastava, S., & Kramer, B. S. (2018). Validation: a critical step in bringing biomarkers to clinical fruition. *Ann Epidemiol*, 28(2), 135-138. doi:10.1016/j.annepidem.2017.10.013
- Stack, E. C., Wang, C., Roman, K. A., & Hoyt, C. C. (2014). Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods*, 70(1), 46-58. doi:10.1016/j.ymeth.2014.08.016
- Steinestel, J., Luedeke, M., Arndt, A., Schnoeller, T. J., Lennerz, J. K., Wurm, C., . . . Schrader, A. J. (2015). Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.3925
- Stoyanova, T., Cooper, A. R., Drake, J. M., Liu, X., Armstrong, A. J., Pienta, K. J., . . . Goldstein, A. S. (2013). Prostate cancer originating in basal cells progresses to adenocarcinoma propagated by luminal-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50), 20111-20116. doi:10.1073/pnas.1320565110
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 189-200. doi:10.1038/nri1568
- Sun, Q., Lesperance, J., Wettersten, H., Luterstein, E., DeRose, Y. S., Welm, A., . . . Desgrosellier, J. S. (2018). Proapoptotic PUMA targets stem-like breast cancer cells to suppress metastasis. *J Clin Invest*, 128(1), 531-544. doi:10.1172/JCI93707
- Sun, Y., Yu, H., Zheng, D., Cao, Q., Wang, Y., Harris, D., & Wang, Y. (2011). Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue. *Arch Pathol Lab Med*, 135(10), 1335-1342. doi:10.5858/arpa.2010-0549-OA
- Suzuki, S., Nakasato, M., Shibue, T., Koshima, I., & Taniguchi, T. (2009). Therapeutic potential of proapoptotic molecule Noxa in the selective elimination of tumor cells. *Cancer Sci*, 100(4), 759-769. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01096.x
- Suzuki, T., Tate, G., Ikeda, K., & Mitsuya, T. (2005). A novel multicolor immunofluorescence method using heat treatment. *Acta Med Okayama*, 59(4), 145-151. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155640>
- Swindle, P., Eastham, J. A., Ohori, M., Kattan, M. W., Wheeler, T., Maru, N., . . . Scardino, P. T. (2005). Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical

- margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol*, 174(3), 903-907. doi:10.1097/01.ju.0000169475.00949.78
- Taberna, M., Torres, M., Alejo, M., Mena, M., Tous, S., Marquez, S., . . . Bravo, I. G. (2018). The Use of HPV16-E5, EGFR, and pEGFR as Prognostic Biomarkers for Oropharyngeal Cancer Patients. *Front Oncol*, 8, 589. doi:10.3389/fonc.2018.00589
- Tambo, M., Higashihara, E., Terado, Y., Nutahara, K., & Okegawa, T. (2009). Comparison of serum HER2/neu with immunohistochemical HER2/neu expression for the prediction of biochemical progression in metastatic prostate cancer. *Int J Urol*, 16(4), 369-374. doi:10.1111/j.1442-2042.2009.02253.x
- Tampio, M., Markkanen, P., Puttonen, K. A., Hagelberg, E., Heikkinen, H., Huhtinen, K., . . . Vahakangas, K. H. (2009). Induction of PUMA-alpha and down-regulation of PUMA-beta expression is associated with benzo(a)pyrene-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Toxicol Lett*, 188(3), 214-222. doi:10.1016/j.toxlet.2009.04.016
- Tateishi, M., Toda, T., Minamisono, Y., & Nagasaki, S. (1992). Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol*, 49(4), 209-212. doi:10.1002/jso.2930490402
- Tevaarwerk, A. J., & Kolesar, J. M. (2009). Lapatinib: a small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer. *Clin Ther*, 31 Pt 2, 2332-2348. doi:10.1016/j.clinthera.2009.11.029
- Thadani-Mulero, M., Portella, L., Sun, S., Sung, M., Matov, A., Vessella, R. L., . . . Giannakakou, P. (2014). Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer. *Cancer Res*, 74(8), 2270-2282. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2876
- Thomas, D. J., Robinson, M., King, P., Hasan, T., Charlton, R., Martin, J., . . . Neal, D. E. (1993). p53 expression and clinical outcome in prostate cancer. *Br J Urol*, 72(5 Pt 2), 778-781. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8281412>
- Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., . . . Coltman, C. A., Jr. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*, 350(22), 2239-2246. doi:10.1056/NEJMoa031918
- Thybusch-Bernhardt, A., Beckmann, S., & Juhl, H. (2001). Comparative analysis of the EGF-receptor family in pancreatic cancer: expression of HER-4 correlates with a favourable tumor stage. *Int J Surg Investig*, 2(5), 393-400. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678544>
- Tome-Garcia, J., Li, D., Ghazaryan, S., Shu, L., & Wu, L. (2014). ERBB2 increases metastatic potentials specifically in androgen-insensitive prostate cancer cells. *PLoS One*, 9(6), e99525. doi:10.1371/journal.pone.0099525
- Tourinho-Barbosa, R., Srougi, V., Nunes-Silva, I., Baghdadi, M., Rembeye, G., Eiffel, S. S., . . . Sanchez-Salas, R. (2018). Biochemical recurrence after radical prostatectomy: what does it mean? *Int Braz J Urol*, 44(1), 14-21. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0656
- Trabzonlu, L., Kulac, I., Zheng, Q., Hicks, J. L., Haffner, M. C., Nelson, W. G., . . . De Marzo, A. M. (2019). Molecular Pathology of High-Grade Prostatic Intraepithelial

- Neoplasia: Challenges and Opportunities. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 9(4). doi:10.1101/cshperspect.a030403
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., . . . Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 16(10), 5276-5287. doi:10.1128/mcb.16.10.5276
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., . . . et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309(5967), 418-425. doi:10.1038/309418a0
- Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F., Oosterhof, G. O., . . . Schalken, J. A. (1994). Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res*, 54(14), 3929-3933. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7518346>
- van der Loos, C. M., de Boer, O. J., Mackaaij, C., Hoekstra, L. T., van Gulik, T. M., & Verheij, J. (2013). Accurate quantitation of Ki67-positive proliferating hepatocytes in rabbit liver by a multicolor immunohistochemical (IHC) approach analyzed with automated tissue and cell segmentation software. *J Histochem Cytochem*, 61(1), 11-18. doi:10.1369/0022155412461154
- van Reesema, L. L. S., Zheleva, V., Winston, J. S., Jansen, R. J., O'Connor, C. F., Isbell, A. J., . . . Tang, A. H. (2016). SIAH and EGFR, Two RAS Pathway Biomarkers, are Highly Prognostic in Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer. *EBioMedicine*, 11, 183-198. doi:10.1016/j.ebiom.2016.08.014
- Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., . . . Chinnaiyan, A. M. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(6907), 624-629. doi:10.1038/nature01075
- Verhoven, B., Yan, Y., Ritter, M., Khor, L. Y., Hammond, E., Jones, C., . . . Pollack, A. (2013). Ki-67 is an independent predictor of metastasis and cause-specific mortality for prostate cancer patients treated on Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 94-08. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 86(2), 317-323. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.01.016
- Verma, R., Gupta, V., Singh, J., Verma, M., Gupta, G., Gupta, S., . . . Ralli, M. (2015). Significance of p53 and ki-67 expression in prostate cancer. *Urol Ann*, 7(4), 488-493. doi:10.4103/0974-7796.158507
- Vexler, A., Lidawi, G., Loew, V., Barnea, I., Karaush, V., Lev-Ari, S., . . . Ben-Yosef, R. (2008). Anti-ERBB4 targeted therapy combined with radiation therapy in prostate cancer. Results of in vitro and in vivo studies. *Cancer Biol Ther*, 7(7), 1090-1094. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443429>
- Vickers, A. J., Cronin, A. M., Aus, G., Pihl, C. G., Becker, C., Pettersson, K., . . . Lilja, H. (2008). A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Goteborg, Sweden. *BMC Med*, 6, 19. doi:10.1186/1741-7015-6-19
- Vigneswara, V., & Kong, A. (2018). Predictive biomarkers and EGFR inhibitors in squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN). *Ann Oncol*, 29(4), 794-796. doi:10.1093/annonc/mdy065

- Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullaer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., . . . Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*, 302(5647), 1036-1038. doi:10.1126/science.1090072
- Voges, G. E., McNeal, J. E., Redwine, E. A., Freiha, F. S., & Stamey, T. A. (1992). Morphologic analysis of surgical margins with positive findings in prostatectomy for adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, 69(2), 520-526. doi:10.1002/1097-0142(19920115)69:2<520::aid-cnrcr2820690240>3.0.co;2-v
- Waggoner, A. (2006). Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr Opin Chem Biol*, 10(1), 62-66. doi:10.1016/j.cbpa.2006.01.005
- Wang, J., Yin, J., Yang, Q., Ding, F., Chen, X., Li, B., & Tian, X. (2016). Human epidermal growth factor receptor 4 (HER4) is a favorable prognostic marker of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(47), 76693-76703. doi:10.18632/oncotarget.12485
- Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P., & Chu, T. M. (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*, 17(2), 159-163. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/89106>
- Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis*, 10(3), 177. doi:10.1038/s41419-019-1407-6
- Whang, Y. E., Armstrong, A. J., Rathmell, W. K., Godley, P. A., Kim, W. Y., Pruthi, R. S., . . . George, D. J. (2013). A phase II study of lapatinib, a dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor, in patients with castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol*, 31(1), 82-86. doi:10.1016/j.urolonc.2010.09.018
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., . . . Huang, D. C. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315(5813), 856-859. doi:10.1126/science.1133289
- Wilson, F. R., Coombes, M. E., Brezden-Masley, C., Yurchenko, M., Wylie, Q., Douma, R., . . . Cameron, C. (2018). Herceptin(R) (trastuzumab) in HER2-positive early breast cancer: a systematic review and cumulative network meta-analysis. *Syst Rev*, 7(1), 191. doi:10.1186/s13643-018-0854-y
- Wind, S., Schnell, D., Ebner, T., Freiwald, M., & Stopfer, P. (2017). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Afatinib. *Clin Pharmacokinet*, 56(3), 235-250. doi:10.1007/s40262-016-0440-1
- Witton, C. J., Reeves, J. R., Going, J. J., Cooke, T. G., & Bartlett, J. M. (2003). Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*, 200(3), 290-297. doi:10.1002/path.1370
- Wolff, J. M., Borchers, H., Brehmer, B., Jr., Brauers, A., & Jakse, G. (1998). Cytokeratin 8/18 levels in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urol Int*, 60(3), 152-155. doi:10.1159/000030240
- Wood, L. S. (2002). Rationale for the epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Semin Oncol Nurs*, 18(4 Suppl 4), 3-10. doi:10.1053/sonu.2002.37406
- Wu, W. S., Heinrichs, S., Xu, D., Garrison, S. P., Zambetti, G. P., Adams, J. M., & Look, A. T. (2005). Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic

- progenitors by repressing puma. *Cell*, 123(4), 641-653. doi:10.1016/j.cell.2005.09.029
- Wu, X., Scott, H., Carlsson, S. V., Sjöberg, D. D., Cerundolo, L., Lilja, H., . . . Bryant, R. J. (2019). Increased EZH2 expression in prostate cancer is associated with metastatic recurrence following external beam radiotherapy. *Prostate*, 79(10), 1079-1089. doi:10.1002/pros.23817
www.arcagy.org/infocancer. <https://www.arcagy.org/infocancer/localisations/cancers-masculins/cancer-prostate/depistage-et-prevention/le-depistage.html/>.
- Xin, L. (2013). Cells of origin for cancer: an updated view from prostate cancer. *Oncogene*, 32(32), 3655-3663. doi:10.1038/onc.2012.541
- Xin, L. (2019). Cells of Origin for Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 1210, 67-86. doi:10.1007/978-3-030-32656-2_4
- Xiong, H., & Zhang, J. (2017). Expression and clinical significance of ATM and PUMA gene in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett*, 14(6), 7825-7828. doi:10.3892/ol.2017.7181
- Xiong, Z., Deng, G., Huang, X., Li, X., Xie, X., Wang, J., . . . Wang, X. (2018). Bone metastasis pattern in initial metastatic breast cancer: a population-based study. *Cancer Manag Res*, 10, 287-295. doi:10.2147/CMAR.S155524
- Xu, J., Gong, L., Qian, Z., Song, G., & Liu, J. (2018). ERBB4 promotes the proliferation of gastric cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep*, 39(6), 2892-2898. doi:10.3892/or.2018.6343
- Yang, B., Etheridge, T., McCormick, J., Schultz, A., Khemees, T. A., Damaschke, N., . . . Jarrard, D. F. (2019). Validation of an epigenetic field of susceptibility to detect significant prostate cancer from non-tumor biopsies. *Clin Epigenetics*, 11(1), 168. doi:10.1186/s13148-019-0771-5
- Yang, X. J., Lecksell, K., Gaudin, P., & Epstein, J. I. (1999). Rare expression of high-molecular-weight cytokeratin in adenocarcinoma of the prostate gland: a study of 100 cases of metastatic and locally advanced prostate cancer. *Am J Surg Pathol*, 23(2), 147-152. doi:10.1097/00000478-199902000-00002
- Yao Huang, Y. C. (2011). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Phosphorylation, Signaling and Trafficking in Prostate Cancer, Prostate Cancer. *Dr. Philippe E. Spiess (Ed.), InTech*. doi:10.5772/27021
- Yarden, Y., & Pines, G. (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*, 12(8), 553-563. doi:10.1038/nrc3309
- Yarilin, D., Xu, K., Turkekul, M., Fan, N., Romin, Y., Fijisawa, S., . . . Manova-Todorova, K. (2015). Machine-based method for multiplex in situ molecular characterization of tissues by immunofluorescence detection. *Sci Rep*, 5, 9534. doi:10.1038/srep09534
- Yee, L. M., Lively, T. G., & McShane, L. M. (2018). Biomarkers in early-phase trials: fundamental issues. *Bioanalysis*, 10(12), 933-944. doi:10.4155/bio-2018-0006
- Yiu, A. J., & Yiu, C. Y. (2016). Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res*, 36(3), 1093-1102. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977004>
- Yoshino, T., Shiina, H., Urakami, S., Kikuno, N., Yoneda, T., Shigeno, K., & Igawa, M. (2006). Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 12(20 Pt 1), 6116-6124. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0147

- Yu, J., & Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S71-83. doi:10.1038/onc.2009.45
- Yun, C. H., Boggon, T. J., Li, Y., Woo, M. S., Greulich, H., Meyerson, M., & Eck, M. J. (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell*, 11(3), 217-227. doi:10.1016/j.ccr.2006.12.017
- Zhang, L., Fang, C., Xu, X., Li, A., Cai, Q., & Long, X. (2015). Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Biomed Res Int*, 2015, 357485. doi:10.1155/2015/357485
- Zhang, L., Wu, B., Zha, Z., Zhao, H., Yuan, J., Jiang, Y., & Yang, W. (2018). Surgical margin status and its impact on prostate cancer prognosis after radical prostatectomy: a meta-analysis. *World J Urol*, 36(11), 1803-1815. doi:10.1007/s00345-018-2333-4
- Zhang, L. N., Li, J. Y., & Xu, W. (2013). A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Gene Ther*, 20(1), 1-7. doi:10.1038/cgt.2012.84
- Zhong, W., Peng, J., He, H., Wu, D., Han, Z., Bi, X., & Dai, Q. (2008). Ki-67 and PCNA expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Invest Med*, 31(1), E8-E15. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18312749>
- Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Feng, J., Liu, X. Q., Wang, C., . . . You, C. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 12(8), 735-742. doi:10.1016/S1470-2045(11)70184-X
- Zhou, M., Shah, R., Shen, R., & Rubin, M. A. (2003). Basal cell cocktail (34betaE12 + p63) improves the detection of prostate basal cells. *Am J Surg Pathol*, 27(3), 365-371. doi:10.1097/00000478-200303000-00010
- Zhou, X., Cella, D., Cameron, D., Amonkar, M. M., Segreti, A., Stein, S., . . . Geyer, C. E. (2009). Lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone for HER2+ (ErbB2+) metastatic breast cancer: quality-of-life assessment. *Breast Cancer Res Treat*, 117(3), 577-589. doi:10.1007/s10549-009-0310-8
- Ziada, A., Barqawi, A., Glode, L. M., Varella-Garcia, M., Crighton, F., Majeski, S., . . . Crawford, E. D. (2004). The use of trastuzumab in the treatment of hormone refractory prostate cancer; phase II trial. *Prostate*, 60(4), 332-337. doi:10.1002/pros.20065
- Zietarska, M., Madore, J., Diallo, J. S., Delvoye, N., Saad, F., Provencher, D., & Mes-Masson, A. M. (2010). A novel method of cell embedding for tissue microarrays. *Histopathology*, 57(2), 323-329. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03602.x
- Zweig, M. H., & Campbell, G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*, 39(4), 561-577. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472349>

